

На правах рукописи

БУРОВ Сергей Владимирович

**НОСИТЕЛИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИПЕПТИДОВ**

02.00.06 – Высокмолекулярные соединения

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук

Санкт-Петербург 2008

Работа выполнена в Учреждении Российской Академии Наук Институте высокомолекулярных соединений РАН.

Научный консультант: член-корр. РАН, доктор химических наук,
профессор Евгений Федорович Панарин

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор Лев Иванович Валуев

доктор химических наук, профессор Николай Алексеевич Лавров

доктор химических наук, профессор Александр Григорьевич Шавва

Ведущая организация:

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» федерального медико-биологического агентства России.

Защита состоится « 26 » февраля 2009 г. в 10 часов на заседании

Диссертационного совета Д 002.229.01 при Учреждении Российской академии наук

Институте высокомолекулярных соединений РАН по адресу:

199004, Санкт-Петербург, В.О., Большой пр. д. 31, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института высокомолекулярных соединений РАН.

Автореферат разослан «__» _____ 2009 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

кандидат физико-математических наук

Долотова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Присоединение низкомолекулярных лекарственных веществ к полимерному носителю широко используется для повышения их биологической активности, растворимости, длительности и избирательности действия. Одним из наиболее актуальных направлений исследований является создание новых полимерных носителей противоопухолевых препаратов. Благодаря особенностям строения и физико-химических свойств макромолекул происходит их постепенное накопление в опухолевой ткани, что позволяет многократно повысить локальную концентрацию присоединенного химиотерапевтического агента.

Тем не менее, общим недостатком используемых медико-биологических полимеров остается низкая избирательность действия, связанная с неоднородностью их состава и сложностью контроля процесса иммобилизации лекарственных веществ.

Одним из перспективных подходов является применение для адресной доставки химиотерапевтических препаратов полипептидных носителей, специфически связывающихся с рецепторами, расположенными на поверхности клеток злокачественных опухолей. При этом терапевтическое действие может быть усилено благодаря наличию у носителя собственной противоопухолевой активности.

Используемые в настоящее время методы позволяют получать аналоги природных пептидов, устойчивые к ферментативному расщеплению, которые обеспечивают эффективный перенос лекарственных соединений к пораженным органам и тканям. Тем не менее, в случае противоопухолевых препаратов, роль полипептидного носителя обычно ограничена специфическим взаимодействием с рецептором, в то время как вопросы его собственного влияния на злокачественные клетки и внутриклеточный транспорт цитотоксического агента изучены недостаточно.

Другим перспективным направлением является применение синтетических полипептидов при генной терапии опухолевых заболеваний. Несмотря на низкую эффективность переноса генов, такие носители не имеют выраженных побочных эффектов и могут использоваться при продолжительном лечении. Вместе с тем, основными причинами, ограничивающими их применение, являются недостаточная избирательность действия и неэффективность в экспериментах *in vivo*.

Поэтому при разработке систем адресной доставки противоопухолевых препаратов особенную актуальность приобретает рациональный выбор структуры полипептидного носителя.

Благодаря наличию на поверхности многих опухолевых клеток специфических рецепторов, отсутствующих в большинстве нормальных тканей, в качестве таких носителей может быть использован ряд природных полипептидов. К числу наиболее перспективных соединений относятся аналоги регуляторного пептида гипоталамуса – люлиберина и фрагментов белков, обеспечивающих межклеточные контакты (RGD-пептидов).

Цель работы. Разработка принципов создания полимерных носителей противоопухолевых препаратов на основе синтетических полипептидов, обладающих собственной цитотоксической активностью.

Для достижения этой цели было необходимо решить следующие задачи:

- 1) Синтезировать ряд аналогов люлиберина и исследовать особенности их противоопухолевого действия, включая прямое влияние на злокачественные клетки.
- 2) Разработать методы модификации структуры полипептидного носителя с целью повышения его цитотоксической активности.
- 3) Синтезировать аналоги люлиберина, обеспечивающие направленный транспорт цитотоксических агентов к опухолевым клеткам, их перенос через клеточную мембрану и доставку в ядро.
- 4) Исследовать возможности применения фрагментов α -цепи фибриногена и их аналогов в составе систем адресной доставки противоопухолевых препаратов.
- 5) Разработать системы доставки в опухолевые клетки «суицидных» генов, основанные на использовании полипептидных носителей, обладающих цитотоксическим действием.

Положения, выносимые на защиту. Применение синтетических полипептидов, обладающих цитотоксической активностью, в качестве носителей противоопухолевых соединений повышает эффективность воздействия на опухолевые клетки.

Модификация полипептидов остатком пальмитиновой кислоты является перспективным подходом при разработке систем адресной доставки цитотоксических агентов.

Преимуществом противоопухолевых соединений на основе аналогов люлиберина, по сравнению с другими природными полипептидами, является комплексное воздействие на клетки ряда аденокарцином в результате подавления секреции стероидных гормонов, направленной доставки цитотоксического агента и стимуляции иммунной системы.

Носители на основе фрагментов α -цепи фибриногена и их аналогов позволяют осуществлять направленный транспорт лекарственных препаратов непосредственно к пораженным органам и тканям.

Эффективность генной терапии опухолевых заболеваний может быть повышена с помощью систем доставки, основанных на использовании пептидов, обладающих противоопухолевой активностью.

Научная новизна. Предложен новый подход к выбору структуры носителей для адресной доставки противоопухолевых препаратов, основанный на использовании синтетических полипептидов, обладающих собственной цитотоксической активностью.

Проведен синтез серии аналогов люлиберина, обладающих комплексным действием на клетки гормонозависимых опухолей в результате подавления секреции стероидных гормонов, направленного транспорта цитотоксического агента, собственной цитотоксической активности и стимуляции иммунной системы.

Показано, что включение остатка пальмитиновой кислоты в структуру полипептидного носителя приводит к повышению его противоопухолевой активности как *in vitro*, так и *in vivo*. Впервые установлено непосредственное взаимодействие аналогов люлиберина с регуляторными участками последовательности гена интерлейкина-2, приводящее к усилению синтеза соответствующей мРНК.

На примере 5-фторурацила разработаны новые методы синтеза гибридных соединений, представляющих собой конъюгаты полипептидных носителей с химиотерапевтическими препаратами.

Впервые разработаны методы химического синтеза, позволяющие получать аналоги люлиберина содержащие фрагменты природных белков, которые обеспечивают направленный транспорт в ядро клетки (сигналы ядерной локализации; NLS). Показано, что включение NLS в последовательность пальмитоилсодержащих

аналогов способствует значительному повышению их цитотоксической активности *in vitro*.

При использовании флуоресцентно меченых пептидов, содержащих остаток пальмитиновой кислоты, исследованы особенности их взаимодействия с клеточной мембраной и проникновения в клетки гепатомы человека, содержащие рецепторы люлиберина.

Показана возможность эффективного использования фрагментов α -цепи фибриногена и их аналогов в системах адресной доставки противоопухолевых и сосудорасширяющих препаратов.

Разработан новый подход к синтезу полипептидных носителей, обеспечивающих адресный перенос генов в опухолевые клетки. Впервые показано, что в качестве таких носителей могут быть использованы аналоги люлиберина, содержащих NLS или доксорубицин.

Практическая ценность и использование работы. Разработан простой и эффективный метод включения 5-фторурацила в структуру полимерного носителя. На основе аналогов люлиберина синтезированы новые носители цитотоксических агентов, обладающие высокой противоопухолевой активностью в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Разработаны методы синтеза полипептидов, способных осуществлять транспорт химиотерапевтических препаратов непосредственно в ядро клетки. В результате исследования взаимосвязи структура – активность получены конъюгаты аналогов люлиберина с цитотоксическими агентами, перспективные для проведения доклинических испытаний. Разработаны системы направленной доставки генов в опухолевые клетки, основанные на применении в качестве носителей аналогов люлиберина, содержащих NLS, и конъюгатов полипептидов с доксорубицином.

Показана возможность применения фрагментов α -цепи фибриногена и их аналогов в качестве носителей для адресной доставки противоопухолевых и сосудорасширяющих препаратов.

Личный вклад автора заключается в постановке цели исследования, разработке теоретических и методологических подходов к решению поставленных задач, участии в их экспериментальном выполнении, а также в анализе, интерпретации и обобщении полученных результатов.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на 4-м международном симпозиуме по применению аналогов люлиберина при терапии опухолевых заболеваний и нарушений репродуктивной функции (Женева, 1996 г.), 27-м Европейском пептидном симпозиуме (Сорренто 2002 г.), международной конференции «СПИД, рак и родственные проблемы» (С.-Петербург 2001 г.), Восточно-Азиатском симпозиуме по применению полимеров для передовых технологий (Самара 2005), 29-м Европейском пептидном симпозиуме (Гданьск 2006 г.), 1-м Индийском пептидном симпозиуме (Хайдарабад 2007 г.), III Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Пушино 2007 г.), 30-м Европейском пептидном симпозиуме (Хельсинки 2008 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 53 работы, из них 21 статья в отечественных и зарубежных журналах, 27 тезисов докладов, 2 авторских свидетельства, 2 патента РФ и 1 международный патент.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 217 стр., включает 7 таблиц, 48 рисунков и состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 268 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Направленный транспорт лекарственных соединений в клетки-мишени является одной из основных проблем при разработке новых противоопухолевых препаратов. Применение данного подхода при химиотерапии онкологических заболеваний позволяет повысить избирательность действия, уменьшить терапевтическую дозу и побочные эффекты.

В системах адресной доставки цитотоксических агентов в качестве носителей широко используются различные по структуре полимеры. Одним из перспективных вариантов таких носителей являются аналоги некоторых пептидных гормонов, рецепторы которых расположены на поверхности опухолевых клеток. Применение синтетических полипептидов для направленной доставки противоопухолевых соединений позволяет существенно уменьшить побочные эффекты, связанные с неспецифическим взаимодействием полимеров с клетками нормальных тканей. Кроме того, в этом случае существует возможность дополнительного избирательного

воздействия на опухолевые клетки при наличии у пептидного носителя собственной биологической активности.

При терапии ряда гормонозависимых опухолей, относящихся к числу наиболее распространенных онкологических заболеваний, широко используются аналоги регуляторного пептида гипоталамуса – люлиберина. В последние годы рецепторы люлиберина обнаружены в клетках большинства аденокарцином, включая опухоли легкого, кишечника, почек и печени. При этом они отсутствуют или в существенно меньшем количестве присутствуют в нормальных тканях, за исключением гипофиза. Высокое содержание рецепторов на поверхности опухолевых клеток, наряду с особенностями внутриклеточного метаболизма и передачи сигналов обуславливает избирательность действия лекарственных препаратов на основе аналогов люлиберина. При этом воздействие на опухоль может быть комплексным и реализоваться за счет снижения уровня стероидных гормонов и направленного транспорта цитотоксического агента.

Вместе с тем, в традиционно используемом подходе возможности модификации структуры рилизинг-гормона для получения конъюгатов с химиотерапевтическими препаратами весьма ограничены, а вопросам влияния полипептидного носителя на опухолевые клетки и внутриклеточный транспорт цитотоксического агента не уделяется достаточного внимания.

В настоящем исследовании, в результате анализа взаимосвязи структура – активность и особенностей механизма действия, на основе аналогов люлиберина разработаны оригинальные носители противоопухолевых препаратов, обладающие собственной цитотоксической активностью. При этом значительно расширены возможности получения конъюгатов с цитотоксическими агентами, синтезированы соединения, обладающие комплексным влиянием на клетки гормонозависимых опухолей.

Большой интерес представляет также использование носителей на основе фрагментов α -цепи фибриногена (RGD-пептидов), обладающих сравнительной простотой структуры наряду с высокой биологической активностью. Такие соединения способны связываться со специфическими рецепторами, расположенными на поверхности опухолевых клеток и эндотелиальных клеток сосудов, питающих опухоль.

Нами исследована возможность применения фрагментов α -цепи фибриногена в качестве носителей для направленного транспорта лекарственных веществ при заболеваниях, сопровождающихся локальной активацией тромбоцитов (атеросклерозе, тромбообразовании, формировании метастазов).

В настоящее время большое внимание уделяется разработке методов генной терапии опухолевых заболеваний. Не смотря на то, что носители на основе синтетических полипептидов обеспечивают меньшую эффективность переноса гена, по сравнению с применением вирусных векторов, такие системы обладают определенными преимуществами в плане безопасности, возможности многократного использования и избирательности действия.

В настоящей работе исследованы возможности применения пептидов для доставки в злокачественные клетки так называемых «суицидных» генов. При этом в качестве носителей были использованы различные по структуре полипептиды, в том числе обладающие собственной цитотоксической активностью.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В РАБОТЕ

Синтез пептидов

При получении использованных в работе полипептидов применяли классический и твердофазный методы. В последнем случае синтез проводили как в ручном варианте, так и на полуавтоматическом пептидном синтезаторе NPS-4000 при использовании полимера Меррифилда, 4-(оксиметил)-фенилацетамидометил-полимера (РАМ), 4-метил-бензгидриламино-полимера (МВНА) и 4-(гидроксиметил)-феноксиметил-полимера (полимер Ванга). Реакцию конденсации проводили однократно, в основном DIC/НОВt методом. В случае положительного теста на наличие непрореагировавших амино или имино групп (нингидриновый или изатиновый тест; реакция с бромфеноловым синим) конденсацию повторяли. Гидрофобную N-концевую группировку присоединяли карбодиимидным методом при использовании свободной пальмитиновой, лауриновой и триметилуксусной кислоты или соответствующих производных N-концевых аминокислотных остатков.

При получении конъюгатов полипептидов с цитотоксическими агентами применяли п-нитрофениловый эфир 1-карбоксиметил-5-фторурацила и

доксорубин, модифицированный глутаровым ангидридом (N-Fmoc-DOX-14-O-гемиглутарат). В последнем случае синтез проводили по методике, предложенной в работах (Nagy, et.al. 1996).

Полученные пептиды отщепляли от полимера с одновременным деблокированием с помощью 1 М раствора трифторметансульфокислоты в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола и этандитиола. При получении этиламидов пептидов отщепление от полимерного носителя проводили под действием безводного этиламина при 0⁰С, с последующим удалением защитных групп в условиях, приведенных выше. Деблокированные пептиды обессоливали путем эксклюзионной хроматографии на сефадексе G-15 и очищали с помощью высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. Для аналогов, модифицированных пальмитиновой, лауриновой или триметилуксусной кислотой, проводили предварительную очистку методом твердофазной экстракции на колонке LiChroprep RP-18.

При получении производных RGD пептидов методом классического синтеза в растворе реакцию конъюгации с 5-фторурацилом проводили по методике, разработанной для аналогов люлиберина. В случае аналога, содержащего группировку NO, пептид со свободной сульфгидрильной группой обрабатывали нитритом натрия в 30%-ной уксусной кислоте.

Конечные продукты характеризовали данными аминокислотного анализа, высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии и масс-спектрометрии. При необходимости для подтверждения структуры полученных соединений использовали УФ и ЯМР спектроскопию.

Биологические испытания

Исследование противоопухолевой активности аналогов люлиберина проводилось в Институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей при Российском онкологическом научном центре РАМН на крысах линии Ас1 и мышях линии С₃Н с перевиваемыми опухолями предстательной и молочной желез, соответственно. Цитотоксическую активность *in vitro* определяли в Медицинском центре Шеба (Тель-Хашомер, Израиль) на различных линиях клеток аденокарциномы человека (АТСС, США), включая карциному молочной железы (MCF7; MDA MB-231), простаты (DU-

145; PC-3; 22RV-1; LNCaP), яичников (OVCAR3), кишечника (SW-48; HT-29; Colo-205) и печени (HepG2) в тесте с окрашиванием жизнеспособных клеток (Nemacolor assay). В качестве контроля использовали нормальные фибробласты F-89. Дополнительные исследования *in vitro* проводили в Институте цитологии РАН.

Взаимодействие флуоресцентно меченого аналога люлиберина с клетками гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) и нормальными фибробластами изучали в Институте цитологии РАН методом лазерной конфокальной микроскопии.

Влияние аналогов на экспрессию гена интерлейкина-2 и синтез матричной РНК исследовали в Институте экспериментальной медицины РАМН при использовании культуры Т-лимфоцитов селезенки мыши.

Биологическую активность фрагментов α -цепи фибриногена и их аналогов изучали в Институте кардиологии РАМН и Центре прикладной микроциркуляции (Луисвилль, США) в тестах ингибиции агрегации тромбоцитов и подавления тромбообразования. Исследование цитотоксической активности проводили в Институте цитологии РАН.

Сравнительное изучение эффективности переноса гена при использовании комплексов пептид/ДНК проводили в отделе биохимии Института экспериментальной медицины РАМН. Подбор соотношения компонентов комплекса проводили на основании данных гель-электрофореза. Эффективность пептидного носителя оценивали в опытах по доставке генов бактериальной β -галактозидазы и люциферазы или «суицидного» гена тимидинкиназы вируса простого герпеса в клетки гепатомы человека *in vitro*.

1. Применение аналогов люлиберина в качестве носителей цитотоксических агентов

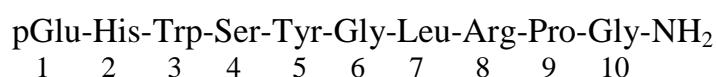
Поскольку прямое действие аналогов люлиберина на опухолевые клетки, как правило, малоэффективно, в ряде работ они используются в качестве носителей для направленной доставки цитотоксического агента непосредственно к клеткам-мишеням, что позволяет уменьшить эффективную дозу и побочные эффекты (Schally, et.al. 1999). Преимуществом данного подхода является воздействие не только на гормонозависимые, но и на гормононезависимые опухолевые клетки, что

препятствует переходу опухоли в состояние не чувствительное к гормональной терапии.

К числу существенных недостатков носителей лекарственных препаратов на основе синтетических полипептидов относится их быстрое расщепление под действием различного рода ферментов. Так, время полужизни люлиберина в организме составляет порядка 4 мин. При получении более стабильных аналогов, используется модификация N- и C- концевых функциональных групп или включение в структуру пептида неприродных аминокислот.

Введение в положение 6 природной последовательности D-аминокислотных остатков повышает устойчивость аналога к энзиматическому расщеплению и его сродство к соответствующему рецептору (рис. 1). Поэтому такие замены широко используются при синтезе высокоактивных агонистов люлиберина (Monahan, et.al. 1973). Дополнительная модификация положения 2 (удаление остатка гистидина или его замена на D-аминокислоты) приводит к получению эффективных антагонистов (Yardley, et.al. 1975).

В настоящее время наиболее широко применяемым методом получения высокоактивных аналогов люлиберина является проведение множественных модификаций с использованием различных неприродных аминокислот. При этом в структуре пептида содержится не более 3–5 аминокислотных остатков, входящих в природную последовательность (рис. 1).



Abarelix	Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal- Ser -NMeTyr-D-Asn- Leu -Lys(iPr)- Pro -D-Ala-NH ₂
Antarelix	Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal- Ser - Tyr -D-Hcit- Leu -Lys(iPr)- Pro -D-Ala-NH ₂
Cetrorelix	Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal- Ser - Tyr -D-Cit- Leu - Arg - Pro -D-Ala-NH ₂
Ganirelix	Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal- Ser - Tyr -D-hArg(Et ₂)- Leu -hArg(Et ₂)- Pro -D-Ala-NH ₂
Iturelix	Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal- Ser -NicLys-D-NicLys- Leu -Lys(iPr)- Pro -D-Ala-NH ₂
Nal-Glu	Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal- Ser -Arg-D-Glu(AA)- Leu - Arg - Pro -D-Ala-NH ₂

Рис. 1. Структура люлиберина и его аналогов, используемых в качестве противоопухолевых препаратов. Жирным шрифтом выделены участки природной последовательности.

Применение такой стратегии, помимо значительного увеличения стоимости

препаратов, в ряде случаев, приводит к соединениям, обладающим токсичностью или вызывающим развитие аллергических реакций.

В настоящей работе предложен новый подход, основанный на модификации положения б, в сочетании с отдельными заменами в N-концевой части молекулы. При этом используется минимальное количество простых по структуре неприродных аминокислот, а выбор положения и способа присоединения химиотерапевтического агента проводится таким образом, чтобы это не снижало эффективности действия пептидного носителя.

2. Носители цитотоксических агентов на основе аналогов люлиберина с укороченной аминокислотной последовательностью

По литературным данным укороченные аналоги люлиберина могут сохранять высокое сродство к рецепторам и даже превосходить в этом отношении природный релизинг-гормон (Naviv, et.al. 1989). Поэтому, такие соединения представляют наибольший интерес с точки зрения простоты получения конъюгатов с химиотерапевтическими агентами. С целью выбора структуры пептидного носителя нами был проведен синтез ряда укороченных аналогов люлиберина и исследовано влияние модификаций в N-концевой части последовательности на гормональную активность.

Учитывая требования стабильности гибридных препаратов в условиях пептидного синтеза и доставки к клеткам-мишеням, в качестве цитотоксического агента использовали 5-фторурацил (5-FU), широко применяемый при терапии опухолевых заболеваний. В ходе предварительных экспериментов с помощью карбамоилхлорида 5-FU был получен трет-бутиловый эфир N^ε-(5-FU-1-ил)-карбонил-N^α-Z-лизина и соответствующий *n*-нитрофениловый эфир. Однако такие соединения оказались недостаточно стабильными в условиях, применяемых при синтезе и очистке пептидных препаратов.

Алкильные производные 5-FU обычно менее активны, по сравнению с исходным соединением, но значительно более устойчивы, чем карбамоильные. Поскольку по литературным данным 1-карбоксиметил-5-фторурацил (CMFU) сохраняет значительную противоопухолевую активность, при получении цитотоксических

аналогов люлиберина было использовано именно это производное.

Синтез CMFU проводили путем кипячения 5-фторурацила в водном растворе КОН с избытком монохлоруксусной кислоты. При этом наряду с алкилированием положения 1, наблюдается частичная модификация положения 3 и для выделения целевого продукта из смеси образующихся производных используется метод ионообменной хроматографии. Структура полученного соединения, помимо данных масс-спектрометрии подтверждается наличием характерного гипохромного эффекта в области 270 нм, наблюдающегося при увеличении pH раствора.

Для активации карбоксильной группы CMFU был использован метод *n*-нитрофениловых эфиров, имеющий определенные преимущества при проведении классического синтеза в растворе. Для упрощения очистки активированного эфира при его получении использовали реактив Сакакибары (трифторацетат *n*-нитрофенола, рис. 2).

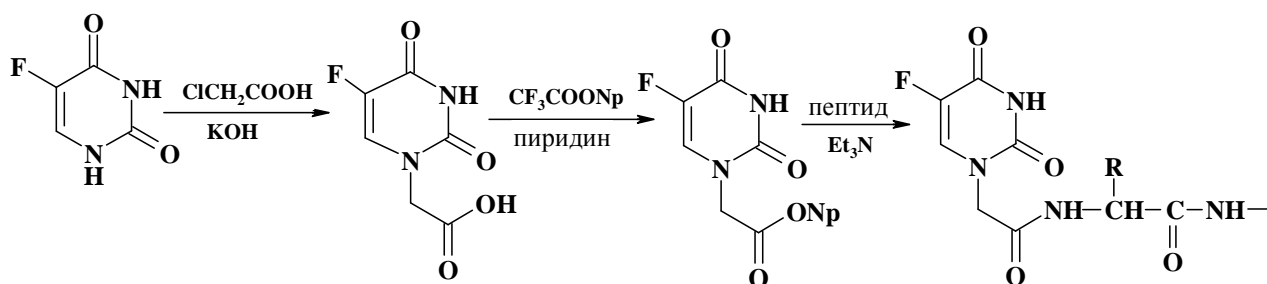


Рис. 2. Присоединение 5-фторурацила к полипептидному носителю.

Пептидные носители на основе укороченных аналогов люлиберина и их конъюгаты с CMFU получали методом классического синтеза в растворе. Исходный гексапептид, синтезировали фрагментной конденсацией по схеме (2+1)+3 с помощью комбинации азидного и дифенилфосфорилазидного методов (рис. 3). Применение такого подхода позволяет, наряду с модификацией N-концевой части молекулы, варьировать природу аминокислотных остатков, вводимых в положение 6, что может быть использовано в процессе оптимизации структуры пептидного носителя (рис. 4).

После удаления защитных групп гидрогенолизом и очистки продукта с помощью ионообменной хроматографии на сефадексе SE C-25 чистота гексапептида (II) составляла более 95%. Дальнейшее наращивание пептидной цепи проводили методом активированных эфиров. Полученные аналоги [D-Asp⁶]-GnRH EA очищали методом ионообменной хроматографии на сефадексе SE C-25 или гель-фильтрации на

сефадексе LH-20 с последующей обращенно-фазовой ВЭЖХ.

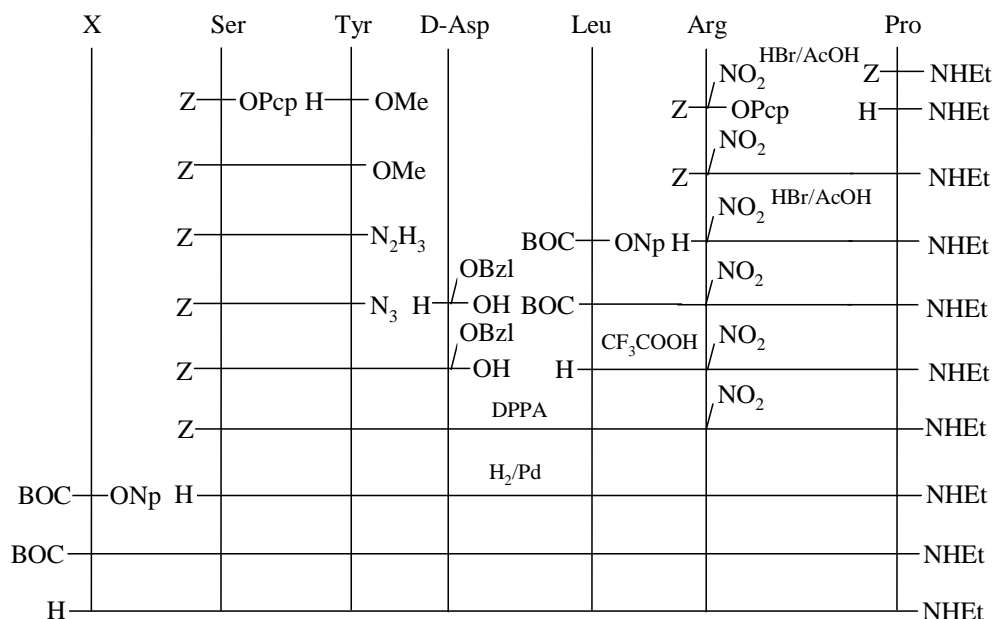


Рис. 3. Схема синтеза укороченных аналогов люлиберина.

- H-Ser-Tyr-**D-Ala**-Leu-Arg-Pro-NHEt (I)
H-Ser-Tyr-**D-Asp**-Leu-Arg-Pro-NHEt (II)
CMFU-Ser-Tyr-**D-Asp**-Leu-Arg-Pro-NHEt (III)
H-Pro-Ser-Tyr-**D-Ala**-Leu-Arg-Pro-NHEt (IV)
H-Pro-Ser-Tyr-**D-Asp**-Leu-Arg-Pro-NHEt (V)
CMFU-Pro-Ser-Tyr-**D-Asp**-Leu-Arg-Pro-NHEt (VI)
H-D-Pro-Ser-Tyr-**D-Ala**-Leu-Arg-Pro-NHEt (VII)
Ns-Pro-Ser-Tyr-**D-Asp**-Leu-Arg-Pro-NHEt (VIII)
pGlu-Ser-Tyr-**D-Ala**-Leu-Arg-Pro-NHEt (IX)
BOC-Phe-Ser-Tyr-**D-Ala**-Leu-Arg-Pro-NHEt (X)
H-Pro-Gly-Ser-Tyr-**D-Ala**-Leu-Arg-Pro-NHEt (XI)

CMFU - 1-карбоксиметил-5-фторурацил; **Ns** - β-Нафталинсульфонил

Рис. 4. Аналоги люлиберина с укороченной аминокислотной последовательностью.

В ходе синтеза цитотоксических аналогов люлиберина было показано, что *n*-нитрофениловый эфир **CMFU** обладает аномально высокой реакционной способностью. Так, при получении пептида (III) реакция ацилирования проходила за 0.5 ч, по сравнению с 48 ч в случае использования пентахлорфенилового эфира пролина (аналог (V)).

Исследование стабильности синтезированных аналогов в плазме крови человека, проведенное методом ВЭЖХ, показало, что пептиды, содержащие 5-фторурацил, в отличие от немодифицированных соединений, устойчивы в течение 24 ч инкубации. В месте с тем, при проведении испытаний *in vivo* на моделях карциномы простаты и опухоли молочной железы, укороченные аналоги вызывали не более чем 40-50%-ное торможение роста опухоли, причем присоединение 5-фторурацила приводило к снижению активности.

Таким образом, применение аналогов люлиберина с укороченной аминокислотной последовательностью в системах направленной доставки противоопухолевых препаратов представляется нецелесообразным из-за существенного влияния цитотоксического агента на гормональную активность пептидного носителя и его взаимодействие с соответствующим рецептором.

3. Получение конъюгатов цитотоксических агентов и аналогов люлиберина с полной аминокислотной последовательностью

Одним из вариантов решения проблемы является применение аналогов люлиберина с полной аминокислотной последовательностью, что позволяет уменьшить влияние цитотоксической группировки на биологическую активность гибридных соединений и их способность к связыванию с рецепторами клеток-мишеней. При этом необходимо исследовать зависимость противоопухолевой активности от структуры пептидного носителя и способа присоединения химиотерапевтического агента.

С целью упрощения синтеза гибридных препаратов, в положение 2 природной последовательности вводили D-фенилаланин, что приводит к соединениям, обладающим высокой антагонистической активностью (Coy, et.al. 1976). Применение антагонистов люлиберина позволяет широко варьировать как структуру N-концевой части молекулы, так и способ присоединения цитотоксической группировки.

Синтез аналогов проводили твердофазным методом при использовании МВНА полимера и ВОС/Vzl стратегии. Ацетилирование N-концевого остатка пролина проводили на полимерном носителе под действием уксусного ангидрида. Для введения пальмитоильной группировки использовали пальмитоил-пролин, который

присоединяли методом симметричных ангидридов. Остаток CMFU присоединяли в растворе, методом активированных эфиров, после отщепления пептидов от полимерного носителя. Структура полученных аналогов представлена на рис. 5.

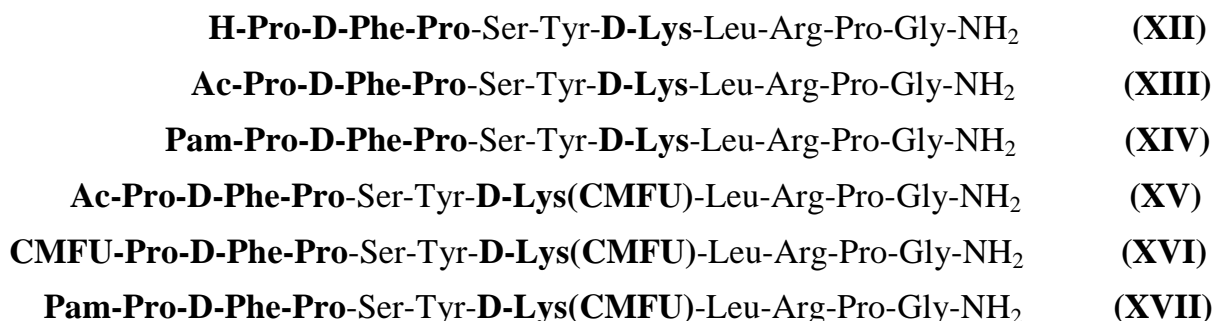


Рис. 5. Структура аналогов люлиберина с полной аминокислотной последовательностью.

Данные биологических испытаний показывают, что присоединение 5-FU позволяет повысить эффективность действия *in vivo* (пептид (XVII), рис. 6), причем N-концевая группировка оказывает существенное влияние на противоопухолевую активность

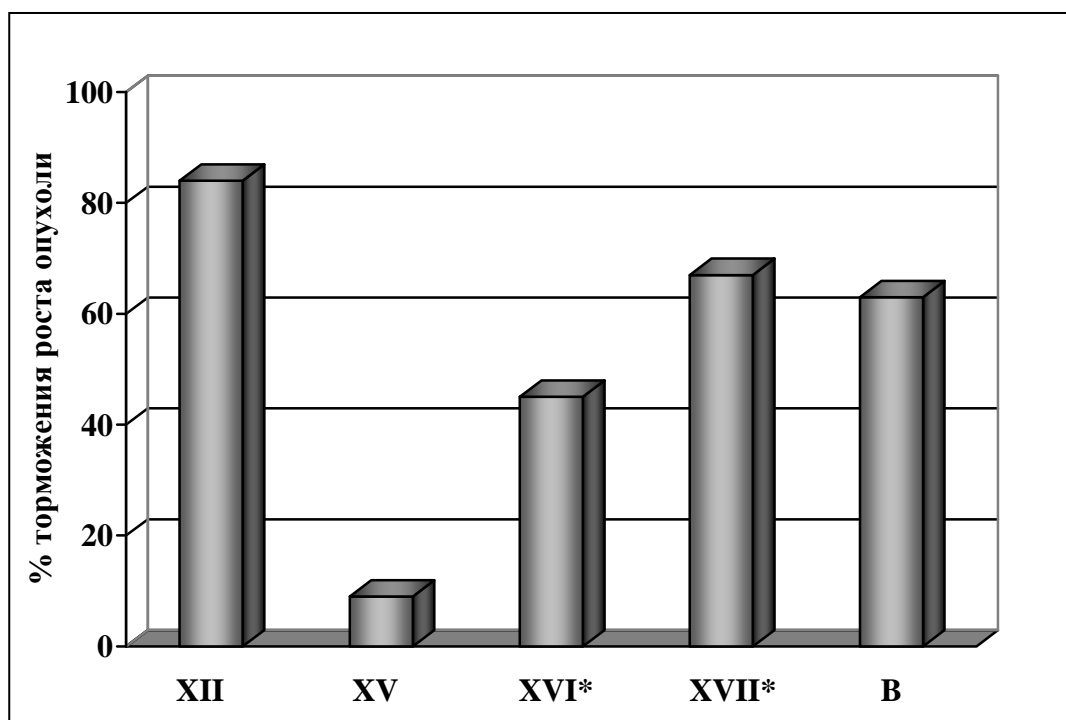


Рис. 6. Противоопухолевая активность аналогов люлиберина на модели карциномы простаты *in vivo*. 29-й день после начала лечения, доза 100 мкг/кг. *- 10 мкг/кг. B – “Buserelin”.

аналогов (соединения (XV), (XVI) и (XVII)). При этом пептиды (XVI) и (XVII) эффективны в дозе 10 мкг/кг веса, по сравнению со 100 мкг/кг для широко используемого препарата “Buserelin”. Исследование цитотоксической активности *in*

in vitro свидетельствует об отсутствии прямого влияния пептида (XII) на клетки карциномы яичников человека CaOv, в отличие от аналогов (XIV) и (XVII). Необычно высокая активность пептида (XII) *in vivo* в дозе 100 мкг/кг, наряду с неэффективностью *in vitro* наводит на мысль о возможном дополнительном механизме подавления опухолевого роста. На основании литературных данных относительно наличия рецепторов люлиберина на поверхности Т-лимфоцитов (Jacobson, et.al. 1998) можно предположить, что некоторые аналоги обладают иммуностимулирующим действием.

Проведенное нами исследование влияния соединений (XII) и (VIII) на иммунную функцию Т-лимфоцитов селезенки мыши показало, что оба пептида обладают стимулирующим действием, усиливая синтез мРНК интерлейкина-2. При этом декапептид (XII) обладал большей эффективностью и продолжительностью действия, что согласуется с его высокой противоопухолевой активностью. Дальнейшие эксперименты с использованием гомологичной и гетерологичной ДНК показали наличие специфического связывания аналога (VIII) с регуляторными участками последовательности гена интерлейкина-2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение аналогов люлиберина с полной аминокислотной последовательностью является перспективным направлением при разработке пептидных носителей цитотоксических агентов. В результате проведенных исследований синтезированы пептиды, обладающие комплексным влиянием на рост опухолевых клеток *in vivo* за счет проявления гормонального, цитотоксического и иммуностимулирующего действия. При этом показано, что модификация N-концевой части последовательности и, в частности, введение пальмитоильной группировки, позволяет существенно повысить противоопухолевую активность гибридных препаратов.

4. Синтез полипептидных носителей, обладающих собственной цитотоксической активностью

Применение аналогов люлиберина при терапии опухолевых заболеваний основано либо на проявлении гормонального действия (снижение уровня стероидных гормонов), либо на возможности их использования для направленного транспорта

химиотерапевтических препаратов к клеткам-мишеням. Вместе с тем, имеются данные относительно прямого влияния аналогов люлиберина на опухолевые клетки, связанного с их способностью индуцировать апоптоз. Недостаточная эффективность такого действия делает актуальной разработку методов модификации аминокислотной последовательности для синтеза пептидных носителей, обладающих собственной цитотоксической активностью.

- Piv-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XVIII)**
Lau-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XIX)
 H-Pro-D-Nal-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XX)
Pam-Pro-D-Nal-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXI)
 H-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-NHEt (XXII)
Pam-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-NHEt (XXIII)
 H-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXIV)
 H-Gly-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXV)
Pam-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXVI)
Lau-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXVII)
Hex-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXVIII)
Pam-Gly-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXIX)
Pam-Pro-Gly-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXX)
Pam-D-Pro-Gly-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXI)
Pam-Lys-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXII)
Pam-Lys-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXIII)
Pam-D-Lys-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXIV)
Pam-D-Lys-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXV)
Pam-D-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXVI)
Pam-Pro-Pro-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXVII)
Pam-D-Pro-Pro-Pro-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXVIII)
Pam-Pro-Gly-D-Leu-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XXXIX)
Pam-Pro-Gly-D-Phe-Ala-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XL)
Pam-Pro-Ala-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XLI)

Рис. 7. Аналоги люлиберина, модифицированные в N-концевой части последовательности.

Полученные на первом этапе исследования данные о высокой противоопухолевой активности пептида (XII) на модели карциномы простаты *in vivo* в сочетании с неэффективностью *in vitro* свидетельствуют об отсутствии прямого цитотоксического действия. В то же время пептид (XIV), модифицированный остатком пальмитиновой кислоты, оказался эффективным при подавлении роста клеток карциномы яичников *in vitro* и на ранней стадии карциномы простаты *in vivo*. Поэтому на следующем этапе работы основное внимание уделялось изучению влияния структуры N-концевой части молекулы на цитотоксическую активность пептидного носителя. С этой целью была получена серия аналогов (XVIII) - (XLI) (рис. 7).

Синтез пептидов проводили твердофазным методом на полуавтоматическом синтезаторе NPS-4000 с использованием Boc/Bzl-стратегии. Аналоги (XVIII)–(XXI) и (XXIV)–(XLI) синтезировали на 4-метилбензгидриламино-полимере, соединения (XXII) и (XXIII) на полимере Меррифилда. Гидрофобную N-концевую группировку присоединяли карбодимидным методом при использовании свободной пальмитиновой, лауриновой, капроновой и триметилуксусной кислоты или соответствующих производных N-концевых аминокислотных остатков.

При определении цитотоксической активности пептидов использовали различные линии клеток аденокарциномы человека, которые по литературным данным содержат рецепторы люлиберина (Nechushtan, et.al. 1997). При этом исследовалось влияние структуры N-концевой группировки и длины пептидной цепи на эффективность действия аналогов. Результаты, полученные в экспериментах на клетках линии Colo-205, оказавшихся наиболее чувствительными к действию пептидов, представлены в табл. 1.

В литературе имеются данные, свидетельствующие об избирательном цитотоксическом действии пальмитиновой кислоты на опухолевые клетки (Harada, et.al. 2002). Поэтому представлялось целесообразным использовать N-концевую пальмитоильную группировку для повышения противоопухолевой активности пептидных носителей и их способности проникать через гемато-энцефалический барьер, что особенно важно при терапии опухолей мозга.

Сопоставление данных биологических испытаний пептидов (XVIII), (XIX), (XXVII) и (XXVIII), а также аналогов (XII), (XIV), (XX), (XXI), (XXII), (XXIII) и (XXIV)–(XXVI) свидетельствует о важности остатка пальмитиновой кислоты для

проявления цитотоксического действия. Так, использование в качестве N-концевой

Таблица 1. Цитотоксическая активность аналогов люлиберина на клетках карциномы кишечника человека Colo-205.

Пептид	Доза	Цитотоксическое действие*
GnRH	$> 10^{-4}$ М	–
(XVIII)	$> 10^{-4}$ М	–
(XIX)	$> 10^{-4}$ М	–
(XX)	$> 10^{-4}$ М	–
(XXI)	5×10^{-5} М	+
(XXII)	$> 10^{-4}$ М	–
(XXIII)	5×10^{-5} М	++++
(XXIV)	$> 10^{-4}$ М	–
(XXV)	$> 10^{-4}$ М	–
(XXVI)	2×10^{-5} М	++++
(XXVII)	$> 10^{-4}$ М	–
(XXVIII)	$> 10^{-4}$ М	–
(XXIX)	10^{-4} М	+++
(XXX)	5×10^{-5} М	++
(XXXI)	5×10^{-5} М	++
(XXXII)	5×10^{-5} М	++
(XXXIII)	5×10^{-5} М	+++
(XXXIV)	3.5×10^{-5} М	++++
(XXXV)	5×10^{-5} М	++++
(XXXVI)	5×10^{-5} М	++
(XXXVII)	5×10^{-5} М	++
(XXXVIII)	5×10^{-5} М	++
(XXXIX)	5×10^{-5} М	++
(XL)	3.5×10^{-5} М	++++
(XLI)	5×10^{-5} М	++

* Число знаков «+» пропорционально уменьшению количества жизнеспособных опухолевых клеток (оценивалось по изменению оптического поглощения элюата при 650 нм).

группировки лауриновой, капроновой (пептиды (XIX), (XXVII), (XXVIII)) или пивалиновой кислоты (пептид (XVIII)) приводит к резкому снижению активности. При этом ни один из исследованных аналогов, за исключением пальмитоильных производных, не обладал выраженным цитотоксическим действием.

Замена D-фенилаланина на D-лейцин (пептид (XXXIX)) приводит к заметному снижению активности, что согласуется с литературными данными о высокой эффективности антагонистов люлиберина, содержащих ароматические D-аминокислоты в положении 2. Увеличение длины пептидной цепи до 11 аминокислотных остатков (аналоги (XXVI) и (XXIX)) или ее укорочение (аналог (XXII)) приводит к высокоактивным соединениям. При этом следует отметить, что в литературе описано лишь несколько активных аналогов люлиберина, содержащих более 10 аминокислотных остатков (Wasiak, et.al. 1979).

Существенное различие в активности пептидов (XXIX) и (XXVI) указывает на важную роль аминокислотной последовательности в N-концевой части молекулы. Данные биологических экспериментов свидетельствуют о существенном влиянии природы и количества аминокислотных остатков, расположенных между пальмитоильной группировкой и положением 1 в структуре рилизинг-гормона, на эффективность цитотоксического действия аналогов (XXX)–(XXXVIII) *in vitro*. Так, включение фрагментов Pro-Gly или D-Pro-Gly (пептиды (XXX) и (XXXI)) в последовательность аналога (XIV) приводит к снижению активности. Аналогичный эффект наблюдается и в случае присоединения остатка лизина к N-концевому пролину пептида (XXVI). В то же время укорочение аминокислотной последовательности на один остаток и/или использование D-лизина (аналоги (XXXIII)–(XXXV)) позволяет получить высокоактивные соединения.

Включение в структуру аналогов второго остатка лизина увеличивает возможности присоединения цитотоксической группировки. При этом наличие в боковой цепи дополнительной ε-аминогруппы позволяет проводить синтез конъюгатов с противоопухолевыми агентами, не затрагивая «активного центра» рилизинг-гормона.

Значительное влияние точечных модификаций не изменяющих существенным образом физико-химические свойства аналогов, на их цитотоксическую активность (замена остатков пролина и глицина на аланин в пептидах (XL) и (XLI)

соответственно), свидетельствует в пользу специфичности действия и возможного участия в этом процессе рецепторов люлиберина. Дополнительным подтверждением такой гипотезы является отсутствие цитотоксического действия аналогов в дозах, губительных для опухолевых клеток, на используемые в качестве контроля нормальные фибробласты человека, не содержащие соответствующих рецепторов.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены аналоги люлиберина, обладающие высокой цитотоксической активностью по отношению к различным клеточным линиям аденокарциномы человека. Эти данные свидетельствуют о перспективности введения остатка пальмитиновой кислоты с целью создания противоопухолевых препаратов с повышенной эффективностью действия. При этом представляет интерес как дальнейшее изучение противоопухолевой активности синтезированных аналогов *in vivo*, так и их применение в качестве носителей цитотоксических агентов.

5. Синтез полипептидных носителей, содержащих сигнал ядерной локализации

Изучение особенностей проникновения в злокачественные клетки пептидного носителя и присоединенного к нему цитотоксического агента является необходимым этапом разработки гибридных противоопухолевых препаратов. Для анализа взаимодействия пептидов с рецепторами, расположенными на поверхности опухолевых клеток и последующего внутриклеточного распределения гибридных препаратов нами был использован флуоресцентно меченый аналог (XXVI)-F.

Флуоресцентную метку вводили в положение 6 природной последовательности с помощью изотиоцианата флуоресцеина, в водном растворе пептида (XXVI) по стандартной методике. Такой способ конъюгации не влияет на способность аналога связываться с рецептором и позволяет получить достаточно стабильное производное.

Исследование влияния пептида (XXVI) и суперактивного агониста люлиберина «аларелина» на взаимодействие аналога (XXVI)-F с клетками HepG2 которые по литературным данным содержат рецепторы люлиберина, показывает наличие дозозависимого подавления связывания (рис. 8). При этом действие «аларелина» проявляется в большей степени, что согласуется с его высокой агонистической

активностью и свидетельствует в пользу проникновения аналога (XXVI)-F внутрь клетки в результате взаимодействия со специфическими рецепторами. Дополнительным подтверждением этого служит отсутствие меченого пептида в цитоплазме нормальных фибробластов человека, использованных в качестве контроля.

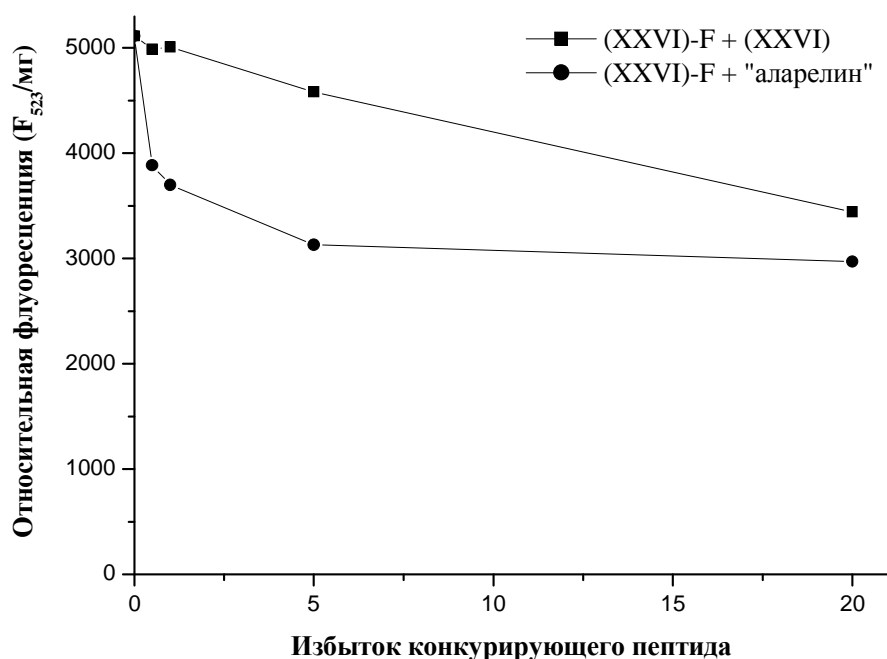


Рис. 8. Влияние аналога (XXVI) и "аларелина" на связывание меченого пептида (XXVI)-F с клетками гепатоцеллюлярной карциномы HepG2.

Применение метода лазерной конфокальной микроскопии указывает на наличие первоначального связывания аналога (XXVI)-F с клеточной мембраной. При этом проникновение меченого пептида в клетки наблюдаются уже через 10 минут инкубации, а через 2 часа он обнаруживается в ядре. Существенным моментом является отсутствие признаков повреждения мембраны, что дополнительно подтверждает предположение о том, что цитотоксическая активность пептидных носителей связана со способностью входящей в их состав пальмитиновой кислоты индуцировать апоптоз.

В настоящее время аналоги люлиберина широко используются при получении гибридных соединений на основе доксорубина и его производных, цитотоксическое действие которых, в первую очередь, связано с нарушением функций ДНК. Поэтому одним из возможных вариантов повышения эффективности

таких химиотерапевтических агентов является их направленный транспорт к внутриклеточным мишеням. В данном случае при выборе структуры носителя могут быть использованы те же принципы, которые используются при разработке пептидных систем доставки генов. При этом проникновение гибридного препарата внутрь опухолевой клетки происходит наиболее эффективным путем – в результате взаимодействия со специфическим рецептором. Далее пептидный носитель может способствовать выходу препарата из образующихся эндосом, доставке цитотоксического агента в ядро и последующему взаимодействию с ДНК.

Следует отметить, что получение носителей, обладающих всеми вышеперечисленными свойствами, является достаточно сложной задачей, особенно в случае аналогов люлиберина, где возможности необходимого изменения исходной структуры весьма ограничены. Поэтому было необходимо разработать новые методы модификации аминокислотной последовательности рилизинг-гормона путем включения в ее состав сигнала ядерной локализации (NLS).

Анализ литературных данных, проведенный с целью выбора достаточно короткой и эффективной структуры, показывает, что в наиболее полной мере этим требованиям отвечает последовательность Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val, входящая в состав ядерного Т антигена вируса SV40. Поскольку принципиальные возможности включения сигнала ядерной локализации в структуру аналогов люлиберина сводятся к модификации положений 1 и 6, в качестве исходного соединения при проведении дальнейших исследований был выбран пептид (XXXIV). Наличие в аминокислотной последовательности аналога второго остатка D-лизина позволяет расширить возможности синтеза за счет использования дополнительной ε-аминогруппы. При этом для сохранения функциональной активности сигнала ядерной локализации N-концевую аминогруппу пролина оставляли незащищенной. Структура полученных аналогов представлена на рис. 9.

Синтез пептидов проводили с использованием комбинации Boc/Bzl и Fmoc/Bu^t стратегии, остаток пальмитиновой кислоты присоединяли карбодиимидным методом. В случае аналога (XLIV) применяли ди-пальмитоил-лизин при проведении реакции конденсации в смеси фенол-хлороформ 1:3. Следует отметить, что получение пептида (XLIV) представляет наибольшую сложность, как вследствие высокой гидрофобности конечного продукта, так и его склонности к образованию комплекса с

ди-пальмитоил-лизином, стабильного в условиях деблокирования и очистки с помощью ВЭЖХ. Для разрушения комплекса и получения конечного продукта перед отщеплением пептида от полимерного носителя проводили дополнительную обработку трифторуксусной кислотой.

H-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

Pam-D-Lys^I-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XLII)

H-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

Pam-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XLIII)

H-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

Pam-D-Lys(Pam)-Pro-Gly-D-Phe-Pro-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (XLIV)

Рис. 9. Структура аналогов люлиберина, содержащих сигнал ядерной локализации.

Результаты биологических испытаний на клетках линии Colo-205 (рис. 10) показывают, что включение в структуру пептидного носителя сигнала ядерной

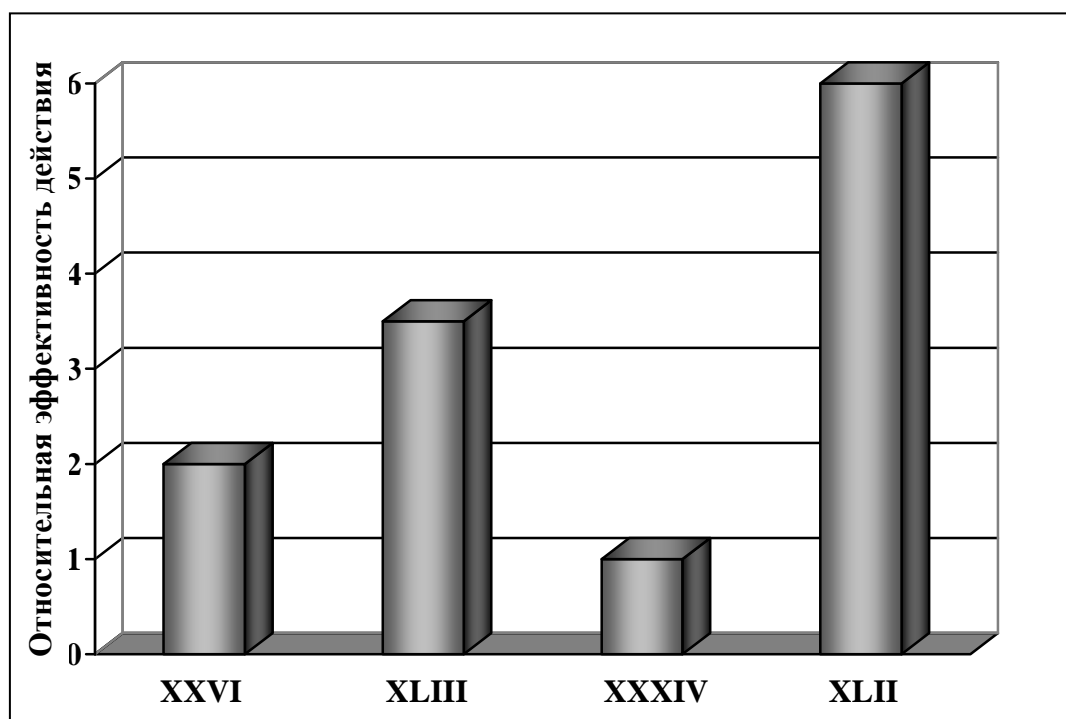


Рис. 10. Влияние сигнала ядерной локализации на цитотоксическую активность аналогов в экспериментах на клетках Colo-205.

локализации приводит к существенному увеличению цитотоксической активности *in vitro* (пептиды (XXVI) и (XLIII); (XXXIV) и (XLII)). В тоже время, вопреки ожиданиям, присоединение дополнительного остатка пальмитиновой кислоты (аналог

(XLIV)) не позволяет повысить эффективность противоопухолевого действия.

Необходимо учитывать, что возможности применения *in vivo* носителей на основе аналогов люлиберина зависят не только от их прямого влияния на опухолевые клетки, но и от гормональной и иммуностимулирующей активности, определяемой способностью связываться с соответствующими рецепторами. Поскольку, по литературным данным, получение конъюгатов при использовании положения 6 природной молекулы не сопровождается потерей гормонального действия более перспективным соединением следует считать пептид (XLIII).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности успешного применения *in vitro* носителей цитотоксических агентов, на основе аналогов люлиберина, содержащих последовательность ядерной локализации. При этом повышение цитотоксической активности пептидов, содержащих пальмитоильную группировку может объясняться наличием мишеней действия, расположенных внутри клеточного ядра. Результаты экспериментов хорошо согласуются с литературными данными о наличии в ядре ряда злокачественных клеток рецепторов люлиберина и их возможной роли в усилении противоопухолевого действия аналогов (Szende, et.al. 1991).

6. Носители лекарственных препаратов на основе RGD-пептидов

Вторым типом носителей цитотоксических агентов, исследованных в ходе выполнения настоящей работы являются RGD-пептиды, избирательно связывающиеся с рецепторами, расположенными на поверхности тромбоцитов. Благодаря наличию такого взаимодействия становится возможной направленная доставка фармакологических агентов в области скопления тромбоцитов, к числу которых относятся участки тромбообразования, атеросклеротического поражения сосудов и метастатические зоны опухолевого роста. В качестве фармакологически активных соединений нами был использован 1-карбоксиметил-5-фторурацил, обладающий противоопухолевой активностью и группировка NO, являющаяся активной частью сосудорасширяющих соединений.

В последнее время показано, что окись азота токсична для большинства линий опухолевых клеток, вследствие повреждения ДНК. При этом нормальные клетки в

основном устойчивы к такому воздействию, что указывает на возможность применения доноров NO при терапии опухолевых заболеваний (Janczuk, et.al. 2002). Таким образом, нитрозопроизводные RGD-пептидов могут представлять интерес в качестве соединений, обладающих как противоопухолевым, так и сосудорасширяющим действием.

С целью проверки полученных нами данных относительно роли пальмитиновой кислоты при получении пептидных носителей, обладающих собственной цитотоксической активностью, был проведен синтез фрагмента природной последовательности (**XLIX**) и его аналога (**L**), содержащего пальмитоил-лизин. При этом остаток лизина использовали для повышения растворимости.

Выбор структуры носителя и положения для модификации проводили на основании способности исходных пептидов подавлять агрегацию тромбоцитов и литературных данных о том, что блокирование N-концевой аминогруппы не уменьшает активности аналогов, в то время как получение производных по C-концевой карбоксильной группе, как правило, приводит к ее значительному снижению (рис. 11).

Аналоги (**XLV**), (**XLVI**), (**XLIX**) и (**L**) синтезировали твердофазным методом на полимере Меррифилда с помощью Boc/Bzl-стратегии. Отщепление полученных продуктов от полимера с одновременным деблокированием проводили действием 1 М раствора TFMSA в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола и этандитиола. Присоединение фармакологически активных группировок проводили в растворе, при этом пептид (**XLVII**) синтезировали с помощью п-нитрофенилового эфира 1-карбоксиметил-5-фторурацила, а соединение (**XLVIII**) получали в результате обработки соответствующего тиола нитритом натрия. В последнем случае индивидуальность полученного продукта контролировали с помощью аналитической ВЭЖХ, а для подтверждения структуры использовали данные ESI MS и УФ спектроскопии (максимумы поглощения при 337 и 545 нм). Аминокислотная последовательность полученных аналогов приведена на рис. 11.

Следует отметить, что получение нитрозотиолов на основе низкомолекулярных полипептидов существенно осложняется тем, что такие соединения имеют высокую склонность к разложению с образованием димеров, содержащих дисульфидную связь. Тем не менее, в настоящее время в клинической медицине используется S-

нитрозоглутатион, являющийся эффективным донором NO и ингибитором агрегации тромбоцитов.

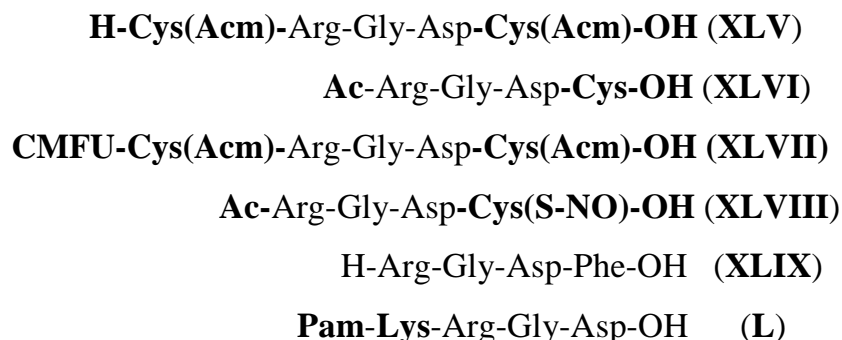


Рис. 11. Структура синтезированных аналогов RGD-пептидов.

Изучение влияния пептидов на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека проведенное в Институте кардиологии МЗ РФ показало наличие достаточно высокой ингибирующей активности немодифицированных соединений ($IC_{50} = 9-11 \mu M$), что свидетельствует о их способности к связыванию с соответствующими рецепторами.

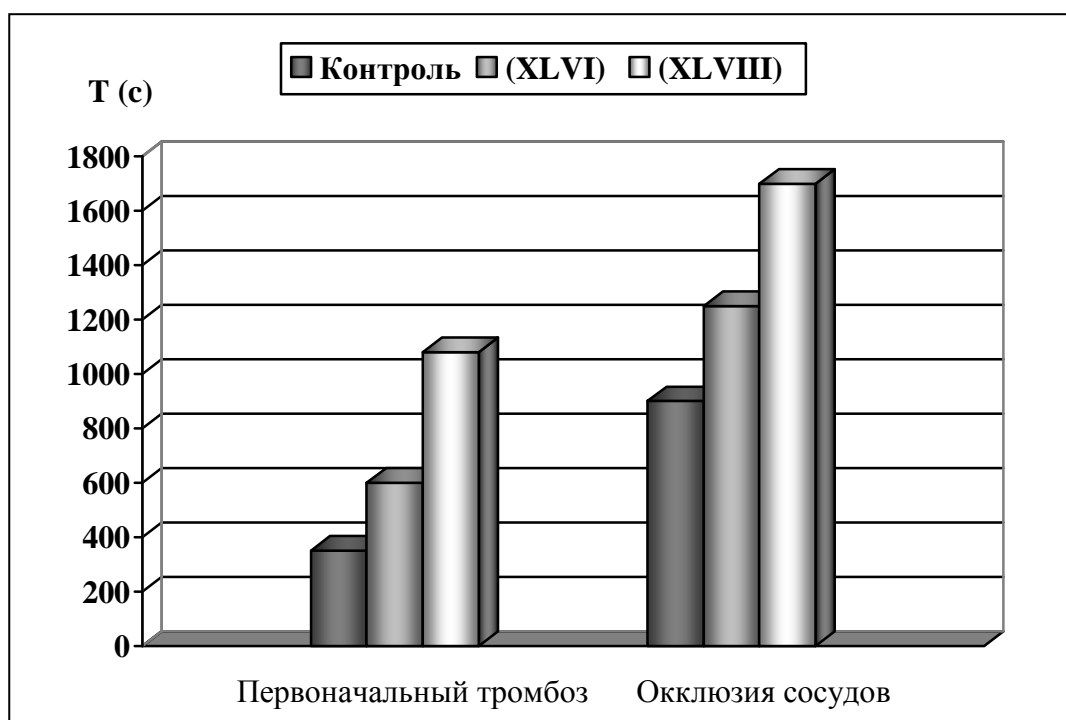


Рис. 12. Влияние внутривенного введения аналогов (XLVI) и (XLVIII) на скорость тромбообразования у крыс линии Sprague-Dawley.

Исследование вазодилаторной активности аналога (XLVIII) и его способности препятствовать тромбообразованию *in vivo*, проводили в Центре прикладной

микроциркуляции (Луисвилль, США). Для индукции образования тромба, использовали фотоактивацию изотиоцианата флуоресцеина, присоединенного к бычьему сывороточному альбумину. Результаты биологических испытаний свидетельствуют о существенно более позднем развитии, как первоначального тромбоза, так и полной окклюзии сосудов в присутствии пептида (XLVIII) по сравнению с контролем и не модифицированным соединением (рис. 12).

Изучение противоопухолевой активности пептида (XLVII) проведенное в Институте кардиологии МЗ РФ на клеточной культуре рака толстого кишечника линии Colo показало, что инкубация опухолевых клеток с исследуемым соединением приводит к достоверному снижению скорости синтеза ДНК, свидетельствующему о наличии антипролиферативной активности. Результаты исследования противоопухолевой активности аналогов (XLIX) и (L) на клетках карциномы молочной железы человека (MCF-7; Институт экспериментальной медицины РАМН) подтверждают полученные нами данные относительно влияния пальмитоильной группировки на свойства пептидного носителя. При этом только пептид (L) обладает выраженным цитотоксическим действием.

Следует отметить, что в последующих работах была показана эффективность применения RGD-пептидов для направленного транспорта доксорубина к опухолевым клеткам (Ruoslahti, et.al. 1998). Эти данные дополнительно подтверждают полученные нами результаты и свидетельствуют о возможности использования рассматриваемых соединений в системах адресной доставки лекарственных препаратов.

Таким образом, пептидные носители, содержащие последовательность RGD являются перспективными для направленного транспорта лекарственных соединений при патологических состояниях, сопровождающихся локальной активацией тромбоцитов (атеросклерозе, тромбообразовании, формировании метастазов). Кроме того, в случае онкологических заболеваний такие соединения могут быть использованы как непосредственно, так и в сочетании с цитотоксическими аналогами люлиберина, воздействующими на клетки первичной опухоли.

7. Использование полипептидных носителей для доставки «суицидного» гена в опухолевые клетки.

Одним из перспективных и быстро развивающихся направлений является генная терапия опухолевых заболеваний, основанная на применении носителей, обеспечивающих избирательное воздействие на опухолевые клетки. В частности, большой интерес представляет разработка методов переноса так называемых «суицидных» генов, к числу которых относится ген тимидинкиназы вируса простого герпеса. При этом злокачественные клетки приобретают способность фосфорилировать противовирусный препарат ганцикловир, что приводит к прекращению синтеза ДНК. Наличие эффекта гибели соседних опухолевых клеток позволяет многократно усилить терапевтическое действие.

В данном исследовании нами была поставлена задача разработать систему адресной доставки «суицидных» генов, основанную на применении аналогов люлиберина и провести сравнительное изучение эффективности новых пептидных носителей и известных из литературы аналогов. В ходе экспериментов использовали нековалентные комплексы пептидов с репортерными генами β -галактозидазы и люциферазы или «суицидным» геном тимидинкиназы. При этом оценивалось влияние структуры носителя, соотношения пептид - ДНК и ряда других факторов на способность комплекса к проникновению в клетки гепатокарциномы человека HepG2, содержащие рецепторы люлиберина. В качестве пептидов сравнения были использованы соединения (LII)–(LIV), представленные на рис. 13.

Хорошо известная из литературы двухкомпонентная система состоит из катионного пептида (LI) и аналога гемагглютинина вируса гриппа (LII), (Gottschalk, et.al. 1996). В этом случае проникновение комплекса в клетку происходит путем эндоцитоза, а основная роль гидрофобного пептида (LII) связана со способностью вызывать разрушение образующихся эндосом за счет литической активности, проявляющейся при кислых значениях pH.

Пептид (LVIII) и флуоресцентно меченый аналог (LVI), содержат участок последовательности (47-57) белка Tat вируса иммунодефицита человека относящийся к так называемым «доменам трансдукции» белков. В данном случае в литературе нет единого мнения по поводу механизма действия такого рода носителей. Кроме того, на

момент проведения работы отсутствовали систематические данные относительно возможности применения их комплексов с ДНК.

Для оценки избирательности действия пептидных носителей на основе аналогов люлиберина, был проведен синтез конъюгата катионного пептида (**LI**) с фрагментом (95-98) α -цепи фибриногена, последовательности RGDF (пептид (**LV**)). В этом случае проникновение комплекса через мембрану происходит при участии рецепторов, расположенных на поверхности как нормальных, так и опухолевых клеток.

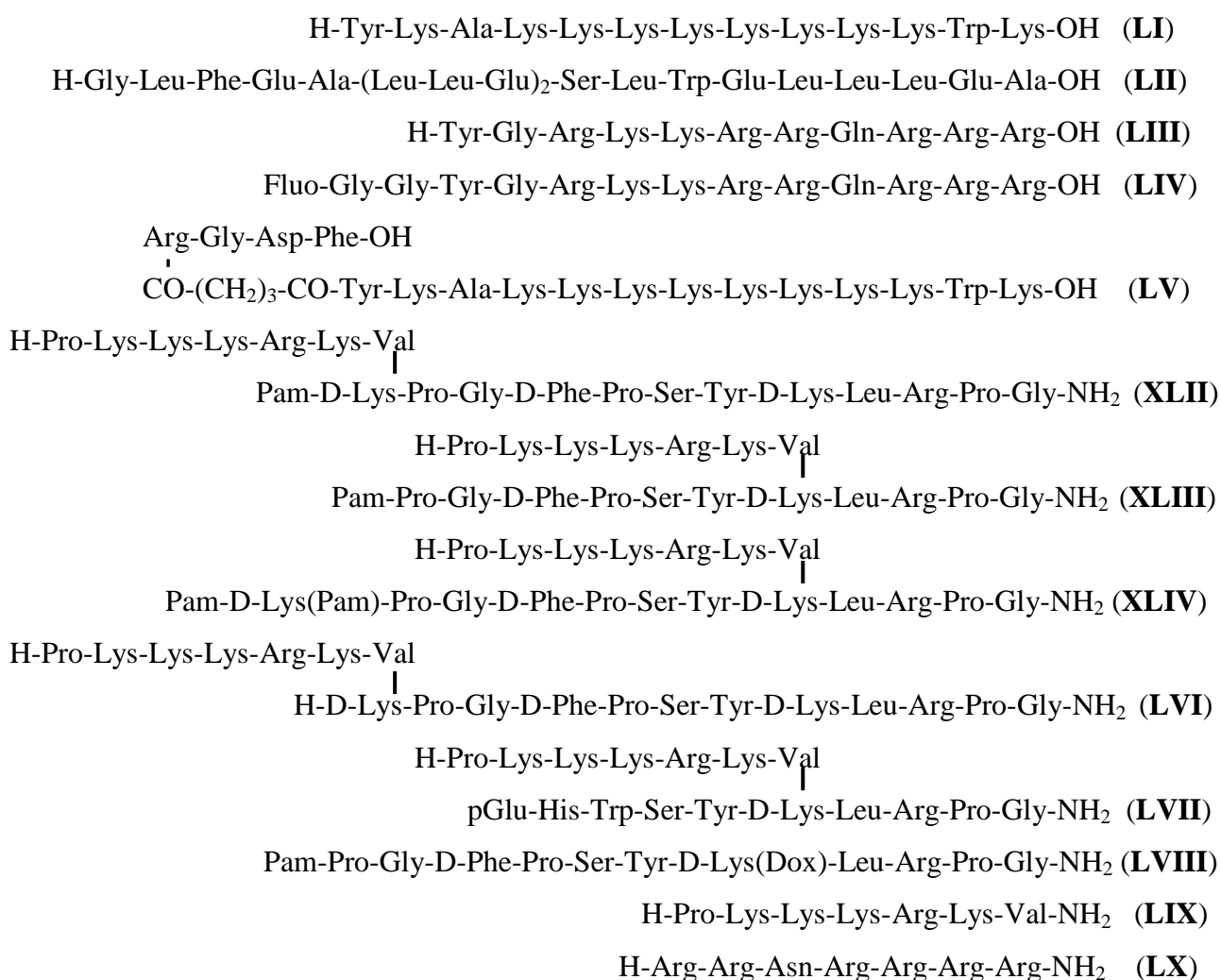


Рис. 13. Структура пептидных носителей, использованных в системах доставки гена.

Поскольку непосредственное применение аналогов люлиберина для доставки «суицидных» генов невозможно из-за неспособности к электростатическому взаимодействию с ДНК, нами были выбраны пептиды (**XLII**)–(**XLIV**), (**LVI**) и (**LVII**), содержащие сигнал ядерной локализации. При этом для оценки влияния структуры пептидного носителя на эффективность переноса гена в экспериментах использовали

аналоги, обладающие как агонистической ((LVII)), так и антагонистической активностью.

Известно, что доксорубин и его аналоги образуют стабильные комплексы с ДНК. Поэтому, теоретически, существует возможность создания систем доставки гена на основе конъюгатов полипептидов и антрациклиновых антибиотиков. Применение таких носителей для доставки «суицидных» генов может привести к уменьшению побочных эффектов и повышению эффективности противоопухолевого действия. Для проверки обоснованности этих соображений нами был получен цитотоксический аналог пептида (XXVI), содержащий доксорубин (соединение (LVIII)).

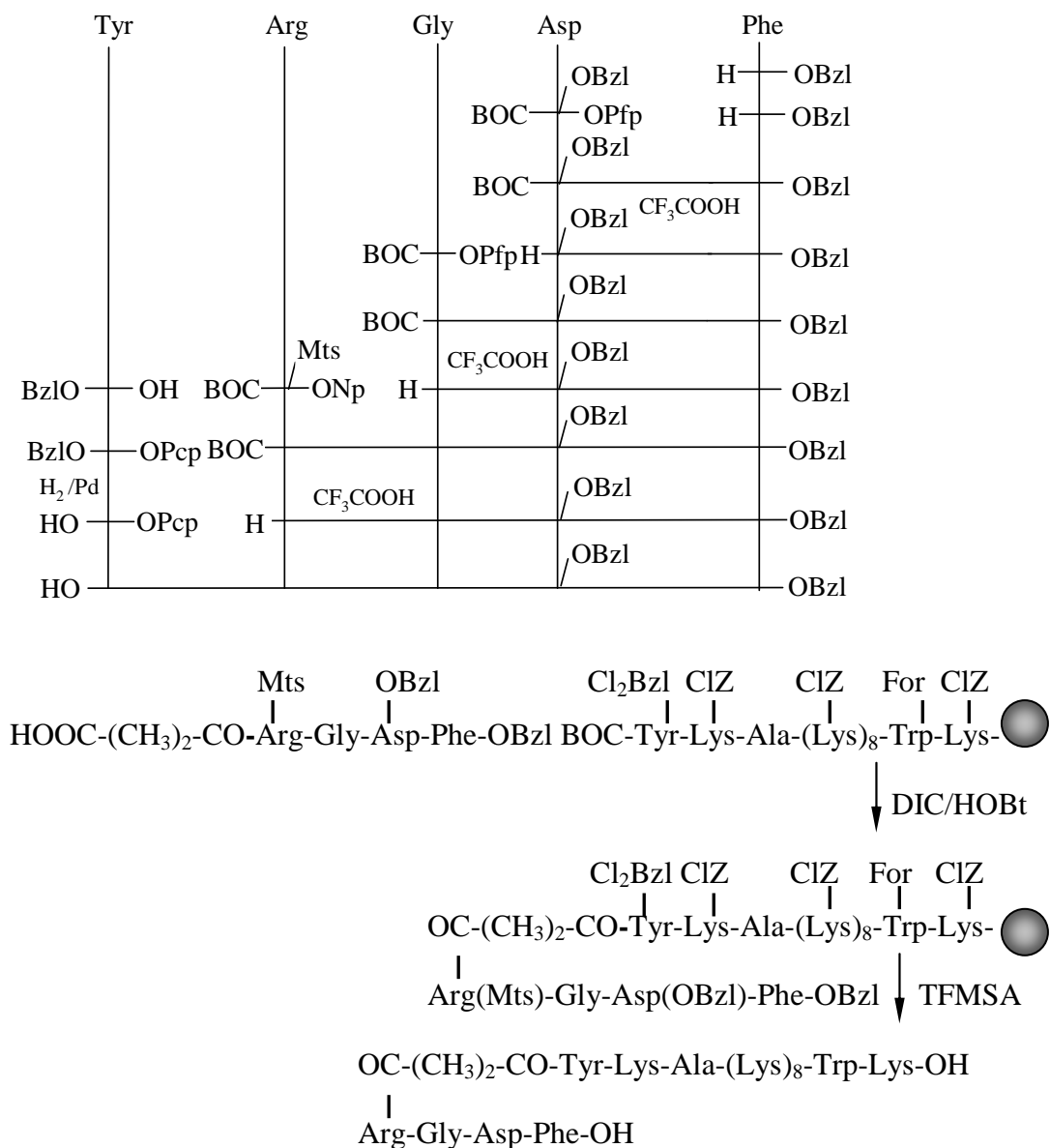


Рис. 14. Схема синтеза аналога (LV).

Синтез пептидных носителей проводили твердофазным методом на полимере Меррифилда и 4-метилбензгидриламино-полимере с помощью Boc/Bzl-стратегии или комбинации Boc/Bzl и Fmoc/Bu^t-стратегии. В случае аналога (**LV**) использовали метод фрагментной конденсации на твердой фазе. При этом защищенный пептид RGDF получали классическим синтезом в растворе с последующей модификацией монопентахлорфениловым эфиром глутаровой кислоты (рис. 14). Фрагментную конденсацию проводили DIC/HOBt методом при использовании 1.5 кратного избытка ацилирующего агента, в объеме набухания полимерного носителя, что позволяет существенно повысить полноту прохождения реакции (Rinnová, et.al. 1999).

При получении аналога (**LIV**), содержащего флуоресцентную метку использовали 4(5)-карбоксихлорофлуоресцеин. Реакцию конденсации проводили на твердой фазе, DIC/HOBt методом. При этом для уменьшения возможного влияния флуоресцентной метки на свойства аналога в качестве спейсерной группировки использовали диглицин. Присоединение доксорубина к пептиду (**XXVI**) осуществляли в растворе по методике, аналогичной использованной в работах Шелли (Nagy, et.al. 1996).

Сравнительное изучение эффективности полученных пептидных носителей проводили в Институте экспериментальной медицины РАМН. Подбор оптимального соотношения компонентов при образовании комплекса пептид/ДНК осуществляли с помощью метода гель-ретардации.

В ходе предварительных экспериментов было показано, что применение пептида (**LI**) обеспечивает перенос репортерных генов в клетки HepG2 в результате эндоцитоза. При этом добавление аналога (**LII**) приводит к 2-х – 3-х кратному увеличению эффективности системы.

Аналогичные результаты получены в случае пептида (**LIII**), для которого была показана возможность образования стабильного комплекса с ДНК и определено оптимальное соотношение компонентов. Сравнительное изучение скорости и условий проникновения через клеточную мембрану флуоресцентно меченого пептида (**LIV**) и его комплекса с ДНК показывает, что перенос гена происходит в результате эндоцитоза. В тоже время свободный пептид проникает в клетку более эффективно.

Результаты экспериментов по доставке плазмидной ДНК в клетки млекопитающих показывают достаточно высокую и сопоставимую эффективность действия соединений (**LI**) и (**LIII**) *in vitro*. Вместе с тем опыты *in vivo*, проведенные на мышах

линии C57B1/6 не привели к положительным результатам (Акифьев Б.Н., 2004 г.).

При разработке системы направленной доставки «суицидных» генов в опухолевые клетки нами были использованы пептидные носители на основе аналогов люлиберина, содержащих сигнал ядерной локализации или доксорубицин. Если в первом случае образование комплексов с ДНК происходит в результате электростатического взаимодействия, то доксорубицин, по литературным данным, образует прочные водородные связи с остатками аденина и гуанина. При этом наличие такого связывания для соединения (LVIII) подтверждается как методом гель-ретардации, так и данными УФ спектроскопии.

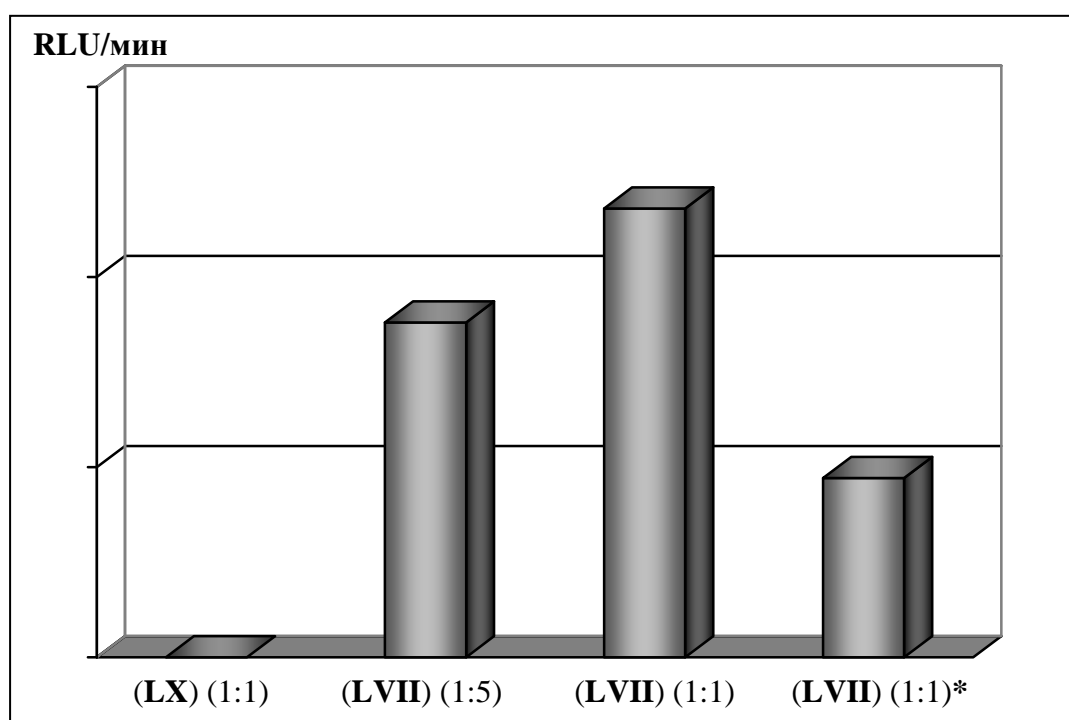


Рис. 15. Влияние соотношения пептид/ДНК на эффективность переноса гена люциферазы в клетки НерG2. * - В присутствии «аларелина». RLU – относительные световые единицы.

В предварительных экспериментах возможность применения аналогов люлиберина в качестве носителей ДНК была исследована на примере доставки гена люциферазы в клетки НерG2 (рис. 15). При этом последовательность ядерной локализации (пептид (LX)) образует стабильные комплексы, которые могут быть использованы для доставки гена в ядро, но не способны самостоятельно проникать через клеточную мембрану. В тоже время в случае аналога (LX) (NLS белка Rev ВИЧ) комплексы пептид/ДНК эффективно переносятся через мембрану в результате эндоцитоза, что

делает его непригодным для адресной доставки «суицидных генов». При использовании аналога (LVII) эффективность системы зависит от состава комплекса, достигая максимальной величины при соотношении пептид/ДНК 1:1.

Для доказательства механизма действия пептидного носителя был использован суперактивный аналог «аларелин», обладающий высоким сродством к рецептору люлиберина, но не способный связываться с ДНК. Добавление «аларелина» приводит к достоверному снижению уровня переноса гена, что свидетельствует в пользу избирательного проникновения комплексов в исследуемые клетки, происходящего при участии специфических рецепторов.

На рис. 16 представлено влияние структуры пептидного носителя на эффективность доставки в опухолевые клетки гена люциферазы. При этом одним из наиболее существенных факторов является способ присоединения сигнала ядерной локализации. Вопреки ожиданиям, в случае аналога (XLIII), где для этого используется положение 6 природной последовательности, уровень люциферазной

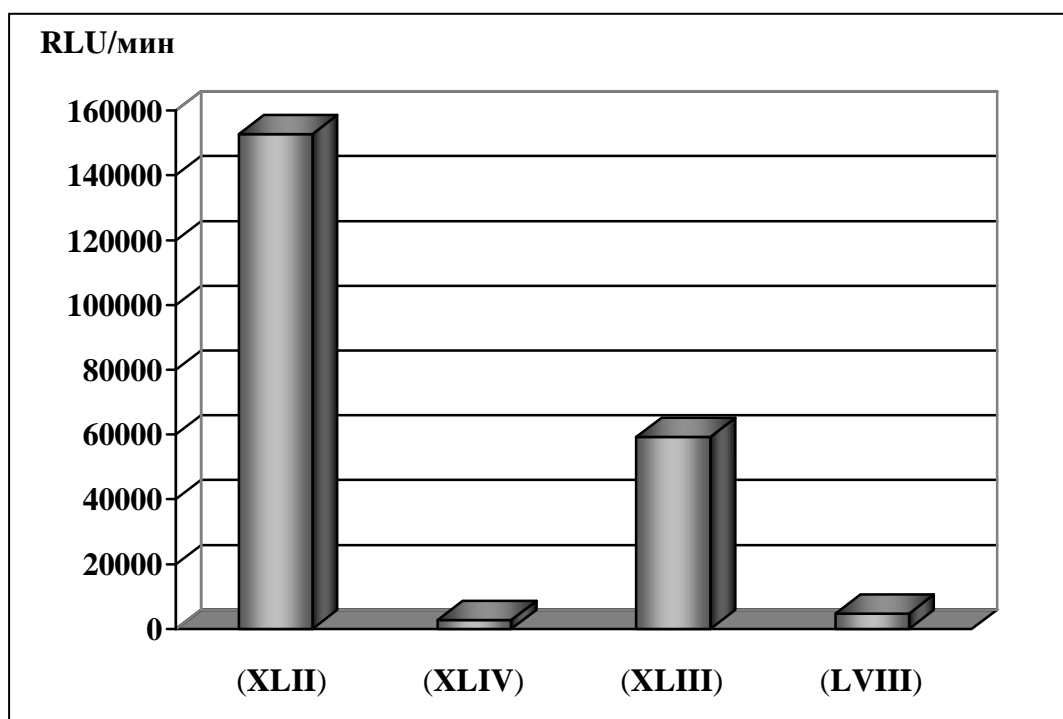


Рис. 16. Влияние структуры пептидного носителя на эффективность доставки люциферазного гена в клетки HepG2. Соотношение пептид/ДНК 1:1.

активности оказался значительно ниже по сравнению с пептидом (XLII), содержащим NLS в N-концевой части молекулы. Низкие величины активности, полученные при использовании аналогов (XLIV) и (LVIII) могут объясняться наличием выраженного

цитотоксического действия у комплексов пептид/ДНК.

Полученные результаты и данные экспериментов *in vitro*, в которых варьировалось соотношение ДНК и пептида (**LVIII**) свидетельствуют о возможности практического применения пептидных носителей, содержащих доксорубицин. При этом особенный интерес представляет их использование в системах адресной доставки «суицидных» генов в опухолевые клетки.

Сравнительное изучение действия различных по структуре пептидных носителей проводили на примере доставки «суицидного» гена тимидинкиназы в клетки HepG2 (рис. 17). При этом критерием эффективности служил процент опухолевых клеток, погибших в результате последующей обработки ацикловиром. Применение известной из литературы двухкомпонентной системы, состоящей из катионного пептида (**LI**), и аналога гемагглютинина вируса гриппа (**LII**), приводило к гибели приблизительно половины клеток по сравнению с 6-12% в контроле.

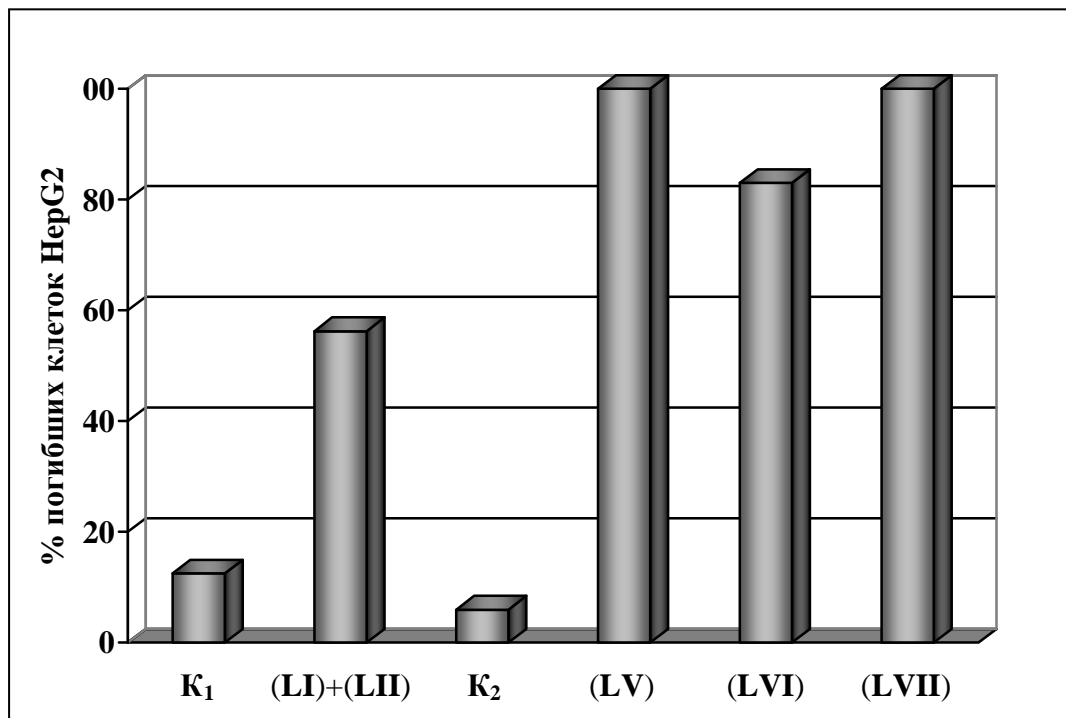


Рис. 17. Влияние структуры носителя «суицидного» гена на количество клеток HepG2, погибших в результате обработки ацикловиром.

Значительно лучшие результаты были получены для гибридного аналога (**LV**), способного, благодаря наличию последовательности RGDF, связываться с рецепторами (интегринами), расположенными на поверхности клеточной мембраны.

В этом случае проникновение комплексов пептид/ДНК происходит более эффективно, что приводит к полному уничтожению злокачественных клеток. Вместе с тем, для повышения избирательности действия пептидного носителя необходимо использовать аналоги последовательности RGDF, селективно взаимодействующие с рецепторами опухолевых клеток. При этом анализ литературных данных показывает, что такая модификация будет приводить к существенному усложнению структуры препарата.

Использование аналогов люлиберина (соединения (LVI) и (LVII)) для доставки «суицидного» гена показывает, что определяющее влияние на эффективность пептидного носителя оказывает природа последовательности, участвующей в процессе взаимодействия с рецептором. При этом повышенное содержание рецепторов люлиберина, отсутствующих в большинстве нормальных тканей делает возможным не только полное уничтожение злокачественных клеток, но и обеспечение высокой избирательности действия.

Полученные предварительные данные показывают, что пептидные носители на основе аналогов люлиберина эффективны не только в экспериментах *in vitro*, но и *in vivo*, что свидетельствует о перспективности их применения в системах адресной доставки «суицидных» генов в опухолевые клетки.

Заключение

Проведенные в ходе работы исследования показывают, что применение носителей на основе синтетических полипептидов позволяет значительно повысить эффективность и избирательность действия противоопухолевых препаратов. При этом выбор структуры носителя и способа присоединения цитотоксического агента проводится с учетом особенностей их биологического действия, включая связывание с рецепторами, расположенными на поверхности опухолевых клеток, проникновение через мембрану и последующее взаимодействие с внутриклеточными мишенями.

Одним из перспективных направлений является использование пальмитоильной группировки для повышения цитотоксической активности синтетических полипептидов. Такие соединения не оказывают влияния на клетки нормальных тканей, что позволяет синтезировать полипептидные носители, обладающие

собственным, избирательным цитотоксическим действием.

Включение в состав полипептидного носителя сигналов ядерной локализации делает возможной доставку ряда химиотерапевтических агентов непосредственно к внутриклеточным мишеням действия, к числу которых относится ДНК и ферменты, принимающие участие в синтезе нуклеиновых кислот. В ходе работы показано, что такая модификация структуры носителя позволяет не только добиться повышения эффективности действия цитотоксических агентов *in vitro*, но и приводит к образованию стабильных комплексов пептид/ДНК, которые могут быть использованы в системах адресной доставки генов в опухолевые клетки.

Интересные возможности открываются в результате исследования конъюгатов полипептидных носителей с доксорубицином или другими интеркалирующими агентами. Такие соединения, обладающие высокой противоопухолевой активностью, могут быть использованы для доставки генов в злокачественные клетки, поскольку образуют прочные комплексы с ДНК за счет водородных связей. При этом уменьшается токсическое воздействие доксорубицина на нормальные ткани и создаются условия для проявления синергического противоопухолевого действия компонентов системы.

Полученные результаты позволяют сформулировать основные принципы, используемые при разработке полипептидных носителей противоопухолевых препаратов. Данные биологических испытаний показывают что синтетические полипептиды являются перспективным типом носителей позволяющим значительно повысить эффективность лекарственных соединений в результате их направленной доставки к клеткам-мишеням и проявления собственной биологической активности.

Выводы

1. Предложен новый подход к решению проблемы адресной доставки противоопухолевых препаратов, основанный на использовании в качестве носителей синтетических полипептидов, обладающих собственной цитотоксической активностью. Возможности практического применения таких соединений исследованы на примере люлиберина и фрагментов α -цепи фибриногена.

2. С целью установления взаимосвязи структура – активность проведен синтез серии аналогов люлиберина, содержащих N-концевую гидрофобную группировку. Впервые показано, что включение остатка пальмитиновой кислоты в структуру полипептидного носителя приводит к повышению противоопухолевой активности как *in vitro*, так и *in vivo*.
3. Разработана новая стратегия получения противоопухолевых соединений на основе аналогов люлиберина, принципиальной особенностью которой является введение цитотоксических группировок в положения 1 или 6 природной последовательности в сочетании с заменой отдельных аминокислотных остатков в N-концевой части молекулы.
4. Предложен простой и эффективный метод синтеза конъюгатов полипептидных носителей с 5-фторурацилом, основанный на применении активированных производных 1-карбоксиметил-5-фторурацила. На примере аналогов люлиберина впервые показано, что такой подход может быть использован для повышения противоопухолевой активности пептидов *in vivo*.
5. Синтезированы новые аналоги люлиберина, обладающие комплексным воздействием на опухолевые клетки благодаря направленной доставке химиотерапевтического агента, гормональной, иммуностимулирующей и собственной цитотоксической активности. Впервые установлено, что стимуляция иммунной системы происходит в результате непосредственного взаимодействия аналогов люлиберина с регуляторным участком последовательности гена интерлейкина-2.
6. Установлено, что включение в структуру полипептидного носителя последовательности, обеспечивающей его направленный транспорт в ядро клетки (сигнала ядерной локализации) приводит к существенному повышению противоопухолевой активности *in vitro*.
7. На примере использования 5-фторурацила и группировки NO в качестве биологически активных соединений показано, что аналоги фрагментов α -цепи фибриногена являются перспективными носителями для направленного транспорта лекарственных препаратов к пораженным органам и тканям.
8. Впервые установлено, что аналоги люлиберина, содержащие последовательность ядерной локализации или интеркалирующие агенты, в отличие от

немодифицированных соединений, способны к образованию стабильных комплексов пептид/ДНК. В экспериментах *in vitro* показано, что применение полипептидных носителей, обладающих противоопухолевой активностью, в составе систем доставки «суицидных» генов позволяет повысить эффективность воздействия на опухолевые клетки.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Буров С.В., Кауров О.А., Мартынов В.Ф. Синтез [D-Phe(NO₂)²; Pro³; D-Ala⁶] и [D-Phe(NH₂)²; Pro³; D-Ala⁶] люлиберина // Хим. прир. соедин. 1980. N 5. С. 706-714.
2. Буров С.В., Николаев С.В., Смирнова М.П., Лупанова Г.Е., Бобров Ю.Ф., Неволин-Лопатин А.М., Китаев Е.М. Синтез биологически активных аналогов люлиберина с укороченной аминокислотной последовательностью // Хим. прир. соедин. 1982. N 6. С. 768-773.
3. Буров С.В., Мартынов В.Ф., Николаев С.В., Смирнова М.П., Корхов В.В. Аналоги люлиберина, проявляющие ингибирующее действие на ход процессов овуляции у животных. Авт. св. N 1028663, 1983 (приоритет от 23 июня 1981 г.).
4. Буров С.В., Николаев С.В., Корхов В.В., Макушева В.П., Лупанова Г.Е. Новые направления синтеза биологически активных аналогов люлиберина // Хим. прир. соедин. 1983. N 3. С. 398-399.
5. Бахарев В.Д., Есипов А.С., Буров С.В., Папсуевич О.С., Чипенс Г.И. Неклассические эффекты люлиберина, подтверждающие многоадресность нейропептидов // Ж. высшей нервной деят. 1985. Т. XXXV. Вып. 1. С. 164-169.
6. Николаев С.В., Буров С.В., Мартынов В.Ф., Подушка С.Б., Казанский Б.Н. Аналоги люлиберина, проявляющие стимулирующее действие на процессы овуляции и икрометание у рыб. Авт. св. N 1389240, 1987 (приоритет от 10 ноября 1985 г.).
7. Korkhov V.V., Makusheva V.P., Lupanova G.E., Burov S.V., Nikolaev S.V. Investigation of the influence of a cyclic luliberin analog on ovulation // Neurosci. Behav. Physiol. 1986. V. 16. N. 6. P. 516-519.
8. Буров С.В., Николаев С.В., Корхов В.В., Лупанова Г.Е., Макушева В.П. Синтез и исследование биологической активности укороченных аналогов люлиберина // Хим. прир. соедин. 1987. N 4. С. 590-595.

9. Николаев С.В., Буров С.В., Бахарев В.Д., Макушева В.П., Корхов В.В. Синтез нового циклического аналога люлиберина // Хим. прир. соедин. 1990. N 6. С. 805-810.
10. Казакова Т.Б., Мюльберг А.А., Буров С.В., Головко О.И., Гришина Т.В., Морозов В.М., Неустроева Л.Ч., Гуцин Г.В. Иммуномодулирующие пептиды, регуляция образования интерлейкина-2 и возможный ее механизм // Бюлл. эксп. биологии и медицины. 1991. Т. СХII. N 7. С. 89-91.
11. Nikolaiev S.V., Sirotkin A.V., Nitray J., Burov S.V. Effects of LF-RH and its chemical analogues on oxytocin, vasopressin and oestradiol secretion by bovine granulosa cells in vitro // *Physiol. Res.* 1991. V. 40. P. 622.
12. Sirotkin A.V., Nitray J., Nikolaiev S.V., Burov S.V. The action of LH-releasing hormone and five analogues on oestradiol, oxytocin and vasopressin secretion by bovine granulosa cells in culture // *J. of Endocrinol.* 1993. V. 136. P. 491-496.
13. Sirotkin A.V., Nitray J., Nikolaiev S.V., Burov S.V., Bulla J. Studium vplyvu LH-RH (Luteinizacny releasing hormon) a jeho analogov na secreciu estradiolu bunkami granulozy vajecnikov krav in vitro. The study of influence of LH-RH and its analogues on oestradiol secretion by granulosa cells ovaries in vitro // *J. Farm. Anim. Sci.* 1993. V. XXVI. P. 33-36.
14. Семко Т.В., Буров С.В., Веселкина О.С., Власов Г.П. Синтез и исследование противоопухолевой активности укороченных аналогов люлиберина // Хим. прир. соедин. 1994. N 5. С. 655-662.
15. Власов Г.П., Буров С.В., Семко Т.В. Декапептид, обладающий противоопухолевой активностью. Патент N 2084458 (приоритет от 27 мая 1993 г).
16. Гуревич В.С., Буров С.В., Попов Ю.Г., Семко Т.В., Власов Г.П. Способ направленного транспорта фармакологических препаратов путем их конюгации с аргинил-глицил-аспартил (RGD) содержащими пептидами. Патент N 2119354 (приоритет от 5 января 1996 г).
17. Казакова Т.Б., Буров С.В., Головко О.И., Гришина Т.В., Новикова Н.С., Мюльберг А.А., Семко Т.В., Корнева Е.А. Биологическая активность аналогов пептидного гормона - люлиберина в регуляции иммунного ответа Т-лимфоцитов // Бюлл. эксп. биологии и медицины. 1996. Т. 122. N 9. С. 334-337.

18. *Gurevich V.S., Lominadze D., Adeagbo A.S.O., Burov S.V., Popov Y.G., Miller F.N., Schuschke D.A.* Usage of RGD peptide for targeted nitric oxide delivery // *Platelets*. 1996. V.7. N 1. P. 83-84.
19. *Gurevich V.S., Lominadze D.G., Adeagbo A.S.O., Burov S.V., Popov Y.G., Leko M.V., Miller F.K., Shuschke D.A.* Antitrombotic and vasorelaxant properties of a novel synthetic RGD peptide containing nitric oxide // *Pharmacology*. 1997. 55. P. 1-9.
20. *Ignatovich I.A., Dizhe E.B., Pavlotskaya A.V., Akifiev B.N., Burov S.V., Orlov S.V., Perevozchikov A.P.* Complexes of plasmid DNA with basic domain 47-57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. N. 43. P. 42625-42636.
21. *Burov S., Epstein N.* Peptides useful for treating GnRH associated diseases. WO 2005/116058 A1. Priority date 27 May 2004.
22. *Буров С.В., Яблокова Т.В., Дорош М.Ю., Шкарубская З.П., Бланк М., Эпштейн Н., Фридкин М.* Аналоги люлиберина, обладающие цитотоксическим действием на опухолевые клетки in vitro. *Биоорг. химия*. 2006. Т. 32. N 5. С. 1-7.
23. *Дизе Э.Б., Игнатович И.А., Буров С.В., Похвоцева А.В., Акифьев Б.Н., Ефремов А.М., Перевозчиков А.П., Орлов С.В.* Комплексы ДНК с катионными пептидами: условия формирования и факторы, влияющие на эффективность проникновения в клетки млекопитающих. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. Вып. 12. С. 1659-1667.