

УДК 577.175

Пептидные гормоны: успехи, проблемы, перспективы

Г. П. Власов

ГЕННАДИЙ ПЕТРОВИЧ ВЛАСОВ — доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией биологически активных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН). Область научных интересов: биоорганическая химия (синтез пептидов, модификация белков, изучение связи структура—активность), химия высокомолекулярных соединений (синтез биологически деградирующих полимеров — носителей биологически активных веществ).

199004 Санкт-Петербург, Большой проспект, 31, ИВС РАН, тел. (812) 323-10-50, факс (812) 328-68-69, E-mail gpvlasov@hq.macro.ru

Синтез пептидных гормонов

Химический синтез первого пептидного гормона — нейрогоипофизарного нонапептида окситоцина (ОТ) был опубликован в виде краткого сообщения в Журнале Американского Химического Общества в 1953 г. Винсентом Дю-Виньо [1]. Окситоцин был получен с использованием классического подхода по схеме синтеза $2 + (3 + 4)$ с применением в качестве блокирующих групп для N^α -аминогрупп аминокислотных и пептидных фрагментов карбобензоксид- и тозилной защиты, бензильной защиты для сульфгидрильной группы цистеина. На стадии создания пептидной связи использовали хлорангидридный и пиррофосфитный методы и метод смешанных ангидридов с изовалерил-хлоридом. Создание дисульфидного мостика проводили окислительной аэрацией при pH 6,5. В результате было получено 360 мг нонапептида, защитные группы которого были удалены действием натрия в жидком аммиаке.

Через год в этом журнале был описан синтез аргинин-вазопрессина (Arg-ВП). Его синтез был выполнен по схеме, близкой схеме получения ОТ [2]. Позднее сообщалось, что на стадии конденсации пептидных блоков при активации С-концевого аспарагина наряду с целевым пептидом было получено соединение, содержащее дегидратированный продукт. Поскольку, как отмечали авторы, исходные компоненты были однородны, и их структура отвечала ожидаемой, было сделано предположение, что образование нового продукта связано с какой-то побочной реакцией. Действительно, это была реакция дегидратации β -амидной группы аспарагина с превращением его в β -CN-аланин. Вероятно, это был первый описанный в литературе пример образования побочного продукта в ходе пептидного синтеза [3]. Впоследствии образование побочных продуктов в ходе пептидного синтеза наблюдали постоянно, что создавало много проблем, которые тем не менее решались достаточно успешно. Это способствовало развитию не только пептидной химии, но и органической химии в целом, частью которой эта область является.

Оба гормона имели активность сравнимую с активностью природных соединений. В последующие годы с использованием классического подхода были получены другие одноцепочечные пептидные гормоны, вершиной этого этапа несомненно были синтезы аденокортикотропного гормона (АКТГ) свиньи [4] и

человека [5], состоящие из 39 аминокислот и синтез двухцепочечного гормона инсулина [6].

Уже через год после введения Р.Б. Меррифилдом [7] твердофазного метода синтеза пептидов (ТФСФ), с его помощью был получен брадикинин [8]. Далее последовали синтезы ангиотензина II [9], окситоцина [10] и других гормонов.

Драматично и поучительно для пептидной химии сложилась судьба синтеза гормона роста человека (ГРЧ), состоящего из 188 аминокислот. Его первичная структура была впервые опубликована в 1969 г. [11]. Через год было сообщено о синтезе этого гормона с использованием ТФСФ [12]. На стадии снятия защитных групп и удаления пептида с полимера использовали жидкий фтористый водород. При выделении гормона с помощью гель-фильтрации полученный продукт, как сообщали авторы, «выходил одним пиком максимально близко к месту на хроматограмме, где выходил природный гормон». Полученный таким образом продукт имел примерно 10% ростпротимирующей активности гормона, в то время как природный ГРЧ, проведенный через процедуру обработки жидким фтористым водородом, имел 35% ростпротимирующей активности. Иммунологические исследования синтетического ГРЧ были также обнадеживающими — антитела, выработанные против природного ГРЧ, взаимодействовали с синтетическим гормоном. Однако вскоре выяснилось, что был получен ошибочный гормон — в ходе определения первичной структуры на стадии соединения блоков была допущена существенная ошибка. Она состояла в том, что было перепутано расположение блоков, из которых строилась последовательность синтетического гормона. Пятнадцатичленный блок, содержащий триптофан, должен был бы занимать другую позицию, и триптофан имел бы номер 85, а не 15, как это было в полученном синтетическом материале [13]. Из этой истории последовали, как минимум, два существенных для всей пептидной химии вывода: во-первых, следует осторожно относиться к данным биологических испытаний, так как синтезированное вещество может иметь определенный уровень гормональной активности (гормоноподобной активности), но не быть идентичным природному соединению. Подтверждением этого были биологические данные для фрагментов ГРЧ последовательности 1—21, 81—121, 122—153, 164—188, которые имели определенный уровень биологической активности [14]. Во-вторых, следует более осторожно относиться к данным иммунологического

тестирования, так как антигенная детерминанта гормона, состоящая из относительно небольшого количества аминокислот, присутствуя в синтетическом «аналоге», будет реагировать с антигормональными антителами независимо от места его расположения, даже в том случае, если полная структура продукта не соответствует структуре природного гормона.

Аналоги пептидных гормонов

Хотя ОТ и ВП имеют близкую первичную структуру, отличаясь только «заменами» аминокислот в третьем и восьмом положениях (см. схему 1), их физиологическое действие различно. ОТ обеспечивает лактацию у женщин в период вскармливания ребенка и сокращение мускулатуры матки при родах. ВП обеспечивает водный баланс организма (антидиуретический эффект) и действует на кровяное давление (прессорный эффект). Оба гормона взаимодействуют с различными рецепторами, относящимися к семейству рецепторов, связанных с G-белком. Факт относительно небольшого различия структур при различном биологическом действии несомненно не мог пройти мимо исследователей. Оба гормона можно было рассматривать в качестве природных «аналогов» друг друга, и это стимулировало исследования по синтезу аналогов пептидных гормонов. Уже в 1967 г. было получено около 120 аналогов ОТ и ВП, а к середине 1980-х годов были синтезированы и исследованы тысячи аналогов этих гормонов.

Одна из причин интенсивного поиска аналогов пептидных гормонов связана с тем, что эти сравнительно небольшие соединения являются чрезвычайно конформационно лабильными. Они проявляют свое действие в результате взаимодействия со специфическими, связанными с мембраной рецепторами, как правило, ассоциированными с G-белком. Однако, использование пептидов как лекарственных средств часто ограничено рядом факторов:

- низкой стабильностью в условиях протеолиза в плазме крови и кишечном тракте: через 2–5 мин после введения пептиды разрушаются ферментными системами организма;
- быстрым выводом из организма через почки и печень;
- плохим проникновением из кишечного тракта в кровь и через кровь в центральную нервную систему;
- побочными эффектами в результате взаимодействия конформационно-подвижных пептидов с различными «нежелательными» типами рецепторов;
- низким эффектом действия, который связан с той же высокой конформационной подвижностью пептидов.

Это далеко не полный перечень недостатков, присущих низкомолекулярным пептидным гормонам. Именно желание избавиться от них явилось причиной

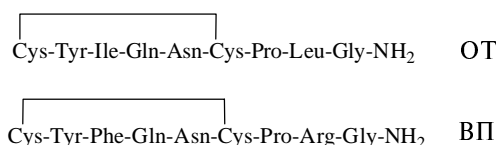


Схема 1. Структура окситоцина и вазопрессина

создания аналогов, которые могли бы обладать улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с их природными прототипами [15, 16].

На первом этапе исследования по поиску аналогов гормонов носили скорее эмпирический характер и были направлены на выяснение роли отдельных аминокислот или их функциональных групп в проявлении того или другого биологического эффекта. Работа сводилась к замене одних аминокислот на другие или к модификации боковых радикалов аминокислот природного гормона и выяснению того, как подобные замены или модификации влияют на биологический ответ. Например, на аналогах окситоцина или вазопрессина выясняли влияние следующих факторов: замены соответствующих аминокислот в положениях 1–9, модификации или замены функциональных групп аминокислот (амино- или оксигрупп), стереохимии отдельных аминокислот и роль дисульфидного мостика, а также влияние размера дисульфидсодержащего цикла на биологическую активность и пространственную структуру гормонов.

Уже в 1960 г. Дю Виньо [17] описал синтез аналога ОТ, это был Tyr(Me)²ОТ, показавший высокую антагонистическую активность *in vitro*. При изучении серии аналогов ОТ и ВП по второму положению, Phe(Me)² и Phe(Et)², а также Tyr(Me)² и Tyr(Et)², выяснилось, что аналоги ОТ и ВП, содержащие Tyr(Me)², как правило, позволяют создавать антагонисты, активные *in vivo* [18]. Позднее было показано, что удаление оксигруппы из тирозина вазопрессина и введение орнитина в восьмое положение приводит к аналогу ВП — [Phe²,Orn⁸]ВП, который является селективным агонистом вазопрессина [19].

Через два года после синтеза первого аналога ОТ, Дю Виньо, удалив N^α-концевую аминокислотную группу, получил агонист ОТ, 1-дезамино-ОТ, активность которого превосходила активность природного гормона [20], положив тем самым начало исследованиям по синтезу аналогов гормонов, у которых удаление аминокислотной группы с N-концевой аминокислоты приводит к аналогам, обладающим более высоким уровнем агонистической активности. Распространение этого подхода на ВП также позволило получить высокоактивные и высокоселективные агонисты ВП, например, 1-дезамино-Arg⁸-ВП [21].

Следующим шагом в поисках более активных агонистов и антагонистов ОТ и ВП были исследования по замене отдельных природных аминокислот на их энантиомеры. Было показано, например, что замена L-цистеина в первом положении на D-цистеин приводит к снижению активности. Эта зависимость распространяется и на α-оксианалоги. В то же время замена L-аргинина в восьмом положении на D-аргинин дает более активный аналог. При модификации одновременно двух позиций был получен высокоактивный и селективный антидиуретический агонист 1-дезамино-D-Arg⁸-ВП [22].

Следующим шагом в развитии работ по изучению связи структура—активность явились исследования по выяснению функциональной роли дисульфидного мостика в ОТ. В 1964 г. Рудингер [23] описал синтез моно-карба(1) и ди-карба(1,6) аналогов 1-дезамино-ОТ и показал, что дисульфидный мостик в ОТ играет не функциональную, а только конформационную

роль, так как эти соединения сохраняли полную биологическую активность исходного 1-дезамино-ОТ.

Псевдопептидные ψ [XXX]-аналоги

Конец 1970-х годов в поиске агонистов и антагонистов пептидных гормонов был отмечен введением в пептидный синтез аналогов гормонов, содержащих модифицированную пептидную связь. Введение заместителей пептидной связи имело конечной целью стабилизацию биологически активной конформации пептидов и значительно расширила возможности получения новых аналогов пептидных гормонов. Однако влияние подобных заместителей пептидной связи на их биологическую активность не всегда однозначно и не могло быть предсказано заранее. Обращает на себя внимание, что часть заместителей пептидной (CO-NH) связи, такие как тиопептидная ψ (CSNH), ретро ψ (NHCO), кето ψ (COCH₂), аминометиленовая ψ (CH₂NH) или сложноэфирная ψ (COOC) в определенном смысле весьма «близки» природной пептидной связи. Другие замены, такие как диметиленовый ψ (CH₂CH₂), транс-этиленовый ψ (E-CH=CH), цис-этиленовый ψ (Z-CH=CH) или ацетиленовый ψ (C≡C) фрагменты, позволяя создавать определенную геометрию замещаемой пептидной связи, были формально весьма далеки от нее по структуре.

Ниже приводится несколько (только несколько!) примеров использования ψ [XXX] вставок в различные природные пептиды и их влияние на активность аналога гормона.

ψ [CH₂NH]-аминометиленовые аналоги. Аминометиленовые аналоги тетрагастрина с различным расположением по цепи ψ [CH₂NH] группы были получены при реакции соответствующего защищенного по аминогруппе N-концевого компонента, содержащего вместо карбоксильной группы альдегидную группу, с аминогруппой C-концевого компонента с последующим восстановлением альдиминной группы NaBH₄CN. [24]. Оказалось, что в опытах *in vitro* *t*-BOC-Trp ψ [CH₂NH]-Leu-Asp-Phe-NH₂ и *t*-BOC-Trp-Leu ψ [CH₂NH]-Asp-Phe-NH₂ имели активность по отношению к рецепторам сравнимую с активностью исходного тетрапептида, однако *t*-BOC-Trp-Leu-Asp ψ [CH₂NH]-Phe-NH₂ был менее активен. Но в опытах *in vivo* активные аналоги повели себя достаточно неожиданно. Аналог *t*-BOC-Trp ψ [CH₂NH]-Leu-Asp-Phe-NH₂ стимулировал секрецию кислоты в анестезированных крысах, т.е. был агонистом, в то время как аналог *t*-BOC-Trp-Leu ψ [CH₂NH]-Asp-Phe-NH₂ был антагонистом. Соединение *t*-BOC-Trp-Leu-Asp ψ [CH₂NH]-Phe-NH₂ было неактивным.

ψ [CH₂O]-метиленоксианалоги. Использование метиленокси-изостерного аналога фрагмента вещества P (Substance P, SP), вида pGlu⁶,Phe⁸ ψ [CH₂O]-Gly⁹SP(6–11), позволило синтезировать активный агонист [25].

ψ [COCH₂]-кетометиленовый аналог. Кетометиленовая группа была введена как между Tyr-Gly, так и между Gly-Gly в Met-энкефалин [26]. При испытаниях *in vitro* H-Tyr ψ [COCH₂]-Gly ψ [COCH₂]-Gly-Phe-Leu энкефалин имел активность менее, чем 0,0001 от опит-связывающей активности Leu-энкефалина. Однако в опытах *in vivo* по анальгезии активность была в 10 раз выше, чем активность исходного Leu-энкефалина. Авторами был сделан вывод о том, что подобная раз-

ница в активностях (в 10000 раз!) кетометиленового аналога в опытах *in vitro* и *in vivo* может быть объяснена устойчивостью к пептидазной деградации.

ψ [CH₂S]-тиометиленовые аналоги. На примере изостерического тиометиленового аналога бомбезина (Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂), содержащего в позиции 13–14 ψ [CH₂S] связь и имеющего структуру Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ [CH₂S]-Met-NH₂, было показано, что аналог хорошо связывается с рецепторами панкреатического бомбезин-рилизинг пептида (*k*_d = 3,9 нМ). Окисление серы и переход к сульфоксидным аналогам (в этом случае возникает два стереоизомера ψ [CH₂SO]) ведет к усилению сродства к рецепторам. Однако, дальнейшее окисление и переход к единственному сульфоновому (ψ [CH₂SO₂]) аналогу бомбезина ведет к падению его активности [27].

ψ [NHC(=CHR)CO]-дегидроаналоги. Исследования по созданию конформационно-заторможенных аналогов соматостатина позволили включить дополнительно в положение 6 высокоактивного аналога соматостатина, цикло(-Pro-Phe-*D*-Trp-Lys-Thr-Phe-), вместо Phe⁶ — дегидро-Phe⁶ [-NHC(=CHC₆H₅)CO-]. В то время как метод ЯМР показал значительное совпадение конформаций исходного и конечного соединений, активность дегидроаналога тем не менее оказалась на уровне только 10% от активности исходного соединения. Был сделан вывод о том, что, по-видимому, более подвижная конформация исходного соединения позволяет ему принимать нужную для рецептора конформацию, в то время как более жесткая структура дегидроаналога препятствует этому [28].

α,α -Диалкилированные глициновые аналоги. Эффект введения конформационно стабилизирующих α,α -диалкильных фрагментов был проанализирован в работах Бенедетти [29, 30].

Конформационно ограниченные циклические (мостиковые) аналоги гормонов

Большая доля модификаций пептидных гормонов приходится на циклические аналоги. По-видимому, это не случайно. Циклические пептидные структуры широко представлены среди природных биологически активных пептидов. Первые синтезированные гормоны, ОТ и ВП, были циклическими аналогами. В связи с проблемой поиска более активных и более избирательно действующих аналогов пептидных гормонов основной целью перехода от линейных пептидов к их циклическим аналогам является все то же стремление зафиксировать пространственную структуру низкомолекулярных пептидов, склонных к образованию набора пространственных структур. По способу получения циклических структур процесс циклизации пептидов можно разделить на две основные группы [31]. Циклопептиды, которые получают при создании связи между концевыми аминокислотами, содержащими аминогруппы, оксигруппы и карбоксильные группы — это подход с замыканием цикла по типу «голова» к «хвосту» (см. схему 2, А). Другой тип циклопептидов получается при создании связи между боковыми группами аминокислот (см. схему 2, Б), содержащих аминогруппы, оксигруппы и карбоксильные группы и присутствующих в пептиде изначально, но не ответственных за биологический эффект, или между боковы-

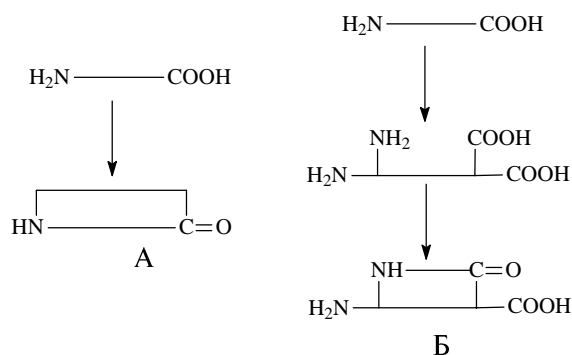


Схема 2. Циклопептиды, полученные при замыкании цикла между N- и C-концевыми аминокислотами (А) и между боковыми группировками аминокислот (Б)

ми группировками специально введенных в первичную структуру пептида (в результате замещения) аминокислот, принципиально не влияющих на биологическую активность: лизина, орнитина, глутаминовой кислоты и серина. Первые работы по циклизации линейных пептидов-предшественников проводили в растворе при разбавлении пептидов-предшественников в момент циклизации до концентрации 10^{-3} – 10^{-4} M, для того, чтобы исключить опасность образования олигомерных продуктов. В качестве активирующих карбоксильную группу соединений использовали и используют практически все известные в пептидной химии методы активации карбоксильной группы — от активированных эфиров и карбодиимида с добавками HONSu, HOBT до современных методов, основанных на фосфониевых (BOP) или урониевых (HBTU, TBTU) соединениях. Циклизация на полимерном носителе, особенно при выборе пути Б, также получила достаточно широкое применение. Этот подход, с одной стороны, включает, как правило, желательное разбавление линейного пептида-предшественника до концентрации 10^{-3} – 10^{-4} M, а с другой стороны, значительно упрощает отделение побочных продуктов. Однако вскоре после начала работ по получению циклических аналогов гормонов пришло понимание того, что скорость циклизации линейного пептида-предшественника и выход желаемого продукта зависят прежде всего от конформации пептида-предшественника, от реакционной способности группировок, участвующих в циклизации, от стабильности предшественника и его склонности к разного рода превращениям и фрагментациям. Стерически затрудненные аминокислоты, N-метилированные аминокислоты и пролин относятся к аминокислотам, создающим очень серьезные проблемы при циклизации.

Введение в линейный пептид-предшественник наряду с L-аминокислотами D-аминокислот еще более усложняет проблему циклизации. То, как решались проблемы циклизации в случае биологически активных пептидов, имеет смысл рассмотреть на примере получения пептидного противоопухолевого антибиотика актиномицина D(C1). Ранее было показано, что при получении циклопентапептида лактона актиномицина D(C1) (его структуру см. на схеме 3) основные проблемы возникали при синтезе именно пентапептида лактонного кольца. Низкий выход циклопептида (26–31%) наблюдался не только на стадии лактонизации, то есть при реакции активированной карбок-

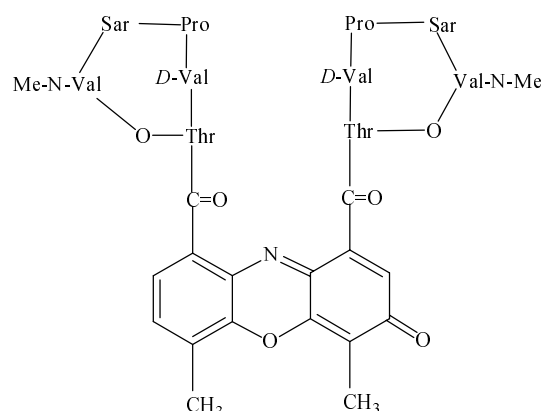


Схема 3. Структура актиномицина D (C1)

сильной группы N-Ме-валина с гидроксильной группой треонина [32] (что, в целом, понятно — участие на стадии циклизации менее нуклеофильной оксигруппы невыгодно), но и на стадии лактамизации, то есть при образовании пептидной связи с участием более нуклеофильных аминогрупп аминокислот. Причиной этого была склонность пептидов, имеющих в своем составе две N-метил-аминокислоты и пролин, к внутримолекулярным фрагментациям и распаду пептидов-предшественников. Выход циклопептида был при циклизации между пролином и саркозином 30% [33], а при циклизации между саркозином и N-метилвалином только 1–3% [34]. Следовательно решение проблемы оптимизации стадии циклизации могло бы быть связано с уменьшением времени существования активированного по C-концу пептида-предшественника, имеющего свободную аминогруппу. Для этого нами был разработан оригинальный метод циклизации линейных пептидов-предшественников.

Идея этого метода состоит в следующем (см. схему 4). Используется линейный пептид-предшественник, имеющий на карбоксильном конце пентахлорфенильный остаток (PCP активированный эфир) или орто-бензилоксифениловый остаток (BOP — замаскировано активированная группа, которая превращается в активированную орто-оксифенильную группу после удаления бензильной защиты с орто-бензилоксифенилового фрагмента), а на N-конце бензилоксикарбонильную защитную группу. Этот пептид

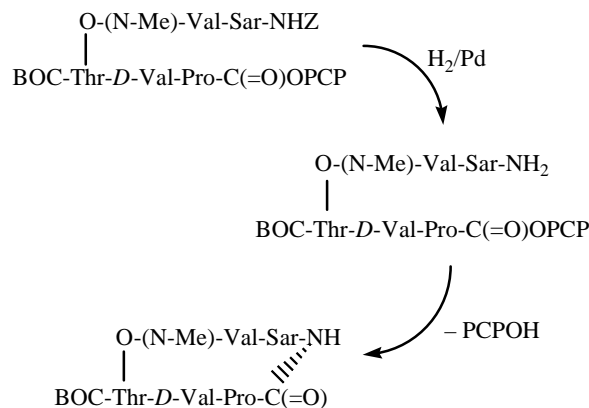
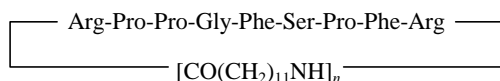


Схема 4. Образование пентапептида лактона актиномицина D(C1)

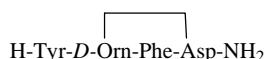
подвергается каталитическому гидрированию — действию газообразного водорода над активированным палладием [35, 36]. В момент восстановительного удаления карбобензоксигруппы с аминного конца линейного пептида-предшественника и бензильного фрагмента (при использовании ВОР-защиты на С-конце) сразу же происходит циклизация (на схеме 4 вновь созданная пептидная связь отмечена пунктиром). Подобные условия удаления карбобензоксигруппы, когда единственными побочными продуктами являются толуол и двуокись углерода — инертные соединения, обеспечивают оптимальные условия циклизации.

В ходе синтеза пентапептидлактонного кольца актиномицина D выход при циклизации между пролином и саркозином был 68% (РСР-эфир) и 51% (ВОР-эфир). При циклизации между D-валином и пролином (РСР-эфир) выход циклопептидлактона был 52%. Однако следует признать, что при циклизации между саркозином и N-метил-валином выход был только 3—5%. По-видимому, проблемы, возникающие при циклизации между двумя стерически затрудненными N-метиламинокислотами, а именно, невыгодная конформация пептида-предшественника и его нестабильность в этом случае уникальны.

Среди отдельных примеров биологической активности гомодетциклических аналогов можно выделить достаточно интересные варианты. Активность циклических аналогов брадикинина, имеющих вставку между аминогруппой N-концевого аргинина и карбоксильной группой С-концевого аргинина коррелировала с размером цикла.

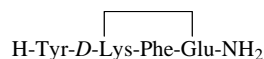


В случае аналога, содержащего между аргининами в положениях 1 и 9 остаток ω -аминододекановой кислоты ($n = 1$), в опытах *in vivo* наблюдался пролонгированный гипотензивный эффект на анестезированных крысах. Аналог же, содержащий два фрагмента той же кислоты ($n = 2$) был неактивен [37, 38]. Эти примеры хорошо подчеркивают важность оптимального размера цикла в аналоге пептида, однако размеры «мостика» были достаточно велики. Важность размера цикла, его «тонкой» подстройки под рецептор, еще раз можно увидеть на примере малоподвижного циклического аналога дерморфина — соединения с 13-членным циклом:



который оказался одним из наиболее селективных лигандов μ -рецептора.

В то же время аналог, имеющий 15-ти членный цикл (и замены орнитина на лизин и аспарагиновой кислоты на глутаминовую):



не имел рецепторной избирательности [39].

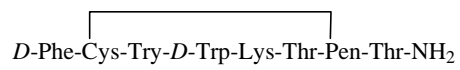
Циклические аналоги фрагмента динорфина, имеющие циклы разных размеров, цикло(Orn⁵, Asp⁸)-динорфин(1-13), цикло(Orn⁵, Asp¹⁰)-динорфин(1-13) и цикло(Orn⁵, Asp¹³)-динорфин(1-13) были получены методом ТФСП с помощью смеси дициклогексилкарбодиимид/гидроксибензотриазол [40]. Только первый аналог из трех был более активен, чем линейный аналог. Два других были менее активны, чем исходный динорфин, соответственно в 460—1350 раз. Был сделан вывод, что циклизация приводит к аналогу, структура которого несовместима с к-рецептором.

Серасодержащие циклические структуры

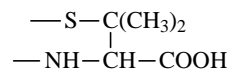
Среди циклических аналогов отдельно нужно выделить циклопептиды, содержащие в своей структуре сульфидные и дисульфидные фрагменты. Среди циклических аналогов природных гормонов дисульфидсодержащие циклы преобладают. В принципе их можно получать, используя оба подхода (схема 2, А и Б), не зависимо от того, где находятся сульфгидрилсодержащие аминокислоты — «внутри» пептида или по его «концам», и применяя широкий набор методов окисления сульфгидрильных групп цистеинов.

Заслуживает быть отмеченным недавно описанный метод циклизации линейных тиоэфиров с использованием ферментов [41]. Интересно, что при попытке циклизовать достаточно длинные линейные пептиды-предшественники, состоящие из 12—31 аминокислот, выяснилось, что то, что практически невозможно сделать с использованием химического подхода, с помощью мутантного субтилизина BPN' (субтилигазы) проходило достаточно быстро. Более того, циклизацию наблюдали именно в случае больших пептидов с выходом от 31 до 85%, а короткие пептиды не циклизовались [42].

Среди данных по биологической активности гетеродетциклических аналогов можно отметить циклический пептид, который является, по-видимому, одним из наиболее активных аналогов, известных до сих пор. Это конформационно ограниченный из-за дисульфидной связи между цистеином² и пенициламином⁷ аналог соматостатина вида:



где Pen — остаток пеницилламина:



Пептид имеет активность в 7800 раз выше, чем активность соматостатина, при сравнении его аффинности к μ -опиатным рецепторам [43].

γ - и β -Поворот и γ - и β -пептидомиметики

Пептидные гормоны являются материальными носителями межклеточной коммуникации. Однако в отличие от нуклеиновых кислот, где информация (генетическая) закодирована в линейной последовательности мономеров (нуклеотидов), в пептидах вследствие их конформационной подвижности это невозможно. В случае пептидных гормонов в передаче информации должны участвовать как пептид-посланник, так и рецептор, а именно фрагмент белка, специфически

взаимодействующий с пептидом. Отбор соответствующих конформаций взаимодействующей пары, их подстройка друг под друга может обеспечить передачу определенной информации от клетки к клетке, от органа к органу. Однако до сих пор имеется относительно мало экспериментальных данных о реальной пространственной структуре как низкомолекулярного пептидного гормона, так и высокомолекулярного компонента — рецептора, после их слияния. Кристаллографическое исследование могло бы дать достаточно материала, но имеется две причины, которые ставят под сомнение полученные результаты. Во-первых, в ходе упаковки в кристалл возникающая структура пептидного компонента может и не соответствовать биологически активной структуре. Кроме того, имеется достаточно примеров кристаллографического полиморфизма, когда одному и тому же соединению могут соответствовать несколько различных конформаций. Даже такой сравнительно небольшой пептид, как лейцин-энкефалин может кристаллизоваться в четырех различных конформациях [44]. Другим примером пептидов, способных существовать в нескольких пространственных вариантах, являются пептидные аналоги, содержащие α,α -диалкиламинокислоты, например, α -метил-аланин (аминоизомасляная кислота, Aib). Пептиды, содержащие эту кислоту, способны существовать как в α -спиральной конформации, так и в спиральной конформации типа 3_{10} .

И только изучение связи структура-активность в результате синтеза большого количества аналогов гормонов позволило найти ключевые аминокислотные остатки, ответственные за связывание с рецепторами. Выяснилось, что такими аминокислотами являются Туг, Трп, His, Phe, а также аминокислоты, несущие заряженные боковые радикалы: гуанидиновую группу (Arg), ϵ -аминогруппу (Lys) и боковые карбоксильные группировки (Asp и Glu) [45]. Что касается основного пептидного «скелета», то оказалось, что в ряде случа-

ев, например, в случае аналогов соматостатина многие пептидные группы могут быть удалены без значительного влияния этой операции на активность [46]. Так был, например, получен циклический аналог соматостатина, в котором пептидный цикл был замещен на моносахаридный пиранозный фрагмент (схема 5, А). Соединение показало антагонистическую активность [47]. В случае TRH агониста в качестве «скелета» циклического фрагмента выступает циклогексановый фрагмент (схема 5, Б) [48]. Однако в других случаях удаление пептидной связи может привести к потере биологической активности. Так уменьшение числа пептидных связей в бомбезине на три уменьшает активность аналога в 200—1000 раз, но дает достаточно активный антагонист в случае замены только двух пептидных связей [49].

Недостаточная активность некоторых аналогов, содержащих неприродные вставки, имитирующие те или иные элементы пространственной структуры становится в определенном смысле понятной, если сравнить фрагмент пептида, имеющего цис-пептидную связь (схема 6, А) и его ω [CN₄]-миметик на основе тетразола (схема 6, Б). Последний (Б) практически идеально имитирует валентные углы и длины связей пептида, но имеет один недостаток — тетразольное кольцо достаточно объемное, и это, по-видимому, мешает соединению, содержащему этот фрагмент нормально взаимодействовать с соответствующими рецепторами [50].

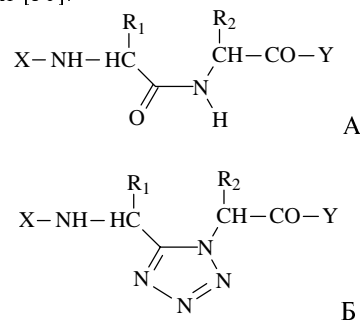


Схема 6. Сравнение пептидной связи и связи, полученной в результате использования ω [CN₄] миметика

В результате изучения пространственной структуры природных гормонов и их синтетических аналогов с использованием различных физических и физико-химических методов можно было заключить, что взаимодействие сравнительно коротких пептидных гормонов с рецепторами в значительной степени предопределено особенностями их структуры. Был сделан вывод о существовании в пептидах относительно стабильных фрагментов, так называемых β - и γ -поворотов (β -, γ -turn). Поворот является одним из трех, наряду с α -спиралью и β -структурой, основных элементов вторичной структуры в пептидах и белках [51]. β -Поворот происходит в случае, когда пептидная цепь поворачивается через 4 аминокислотных остатка так, что карбонильный атом кислорода первого остатка (i) и амидный NH протон четвертого остатка ($i+3$) сближаются в пространстве (схема 7). При этом в большинстве случаев наблюдается образование внутримолекулярной водородной связи между i и $i+3$ аминокислотными остатками пептидной цепи с образованием псевдо-10-членного кольца [52]. В γ -повороте пептидная цепь поворачивается, захватывая три остатка и

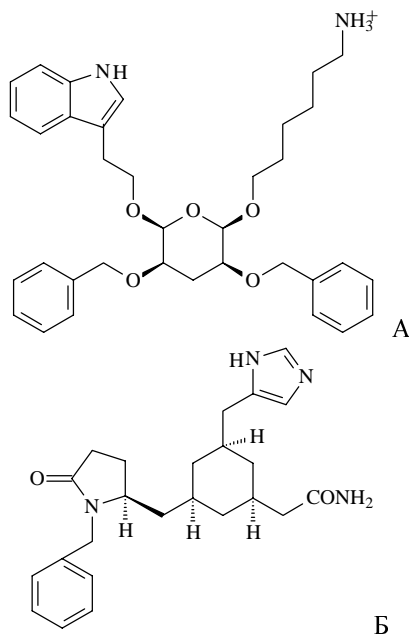


Схема 5. Замена циклопептидной структуры моносахаридным и циклогексановым фрагментом

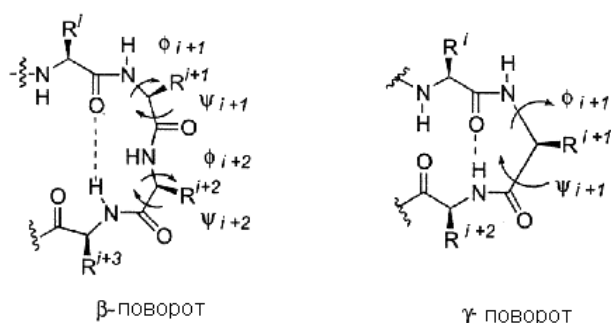
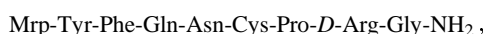


Схема 7. β -, γ -Повороты в пептидах

водородная связь часто образуется между C=O остатка i и NH остатка $i+2$, образуя таким образом псевдо-7-членный цикл (схема 7). Термин «открытый» поворот относится к β - и γ -поворотам, когда внутренняя водородная связь отсутствует. Повороты часто расположены на поверхности и служат сайтами узнавания при взаимодействии, например, гормонов с рецепторами и антигенов с антителами [53]. Структурные изучения показали, что большое количество малых биологически активных пептидов могут принимать γ - или β -поворот. До одной трети аминокислотных остатков в пептиде может находиться в β и γ -поворотах. Среди подобных пептидов — окситоцин [54, 55], вазопрессин и его синтетический аналог десмопрессин [56]:



а также ангиотензин II [57] и брадикинин [58].

Если макроцикл ОТ или ВП достаточно конформационно стабилен вследствие присутствия в нем соответствующего поворота, то их ациклический «хвост» является высоко подвижным. Для десмопрессина было найдено, что в водном растворе при pH близким к физиологическому его структура содержит стабильный инверсный γ -поворот, с центром около Gln⁴. Интересно, что этот γ -поворот для ВП был предсказан, когда провели компьютерное моделирование комплекса ВП с моделью рецептора V_{1a} [59]. Более того, конформация десмопрессина в воде сильно напоминает структуру окситоцина, связанного с нейрофизином, ОТ-переносящим белком [60].

С учетом определенных требований были разработаны методы синтеза γ - и β -миметиков, имитирующих поворот, и способы их внедрения в пептиды для получения пептидомиметиков. Среди большого количества фрагментов, имитирующих поворот, встречаются, например, такие, как показанные на схеме 8. Обсуж-

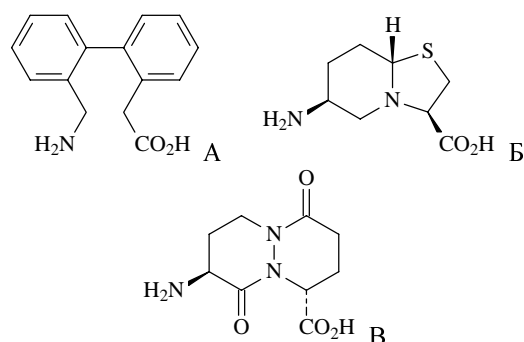
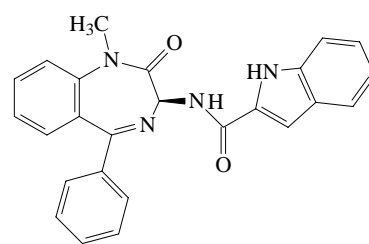
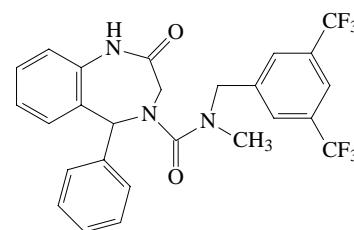


Схема 8. Примеры γ - и β -миметиков, разработанных для введения в пептидомиметики

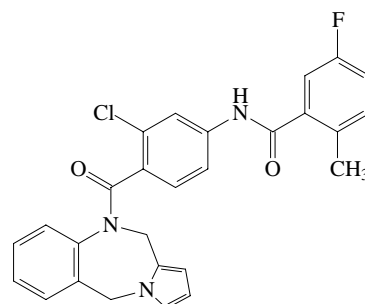
дая проблему синтеза пептидомиметиков невозможно не вспомнить о комбинаторной химии. Принцип пептидных библиотек, основанный на ТФСП и на первом этапе используемый именно для поиска оптимальных вариантов биологически активных пептидов, оказал революционизирующее воздействие на поиск биологически активных миметиков. Часто один и тот же фрагмент может быть положен в основу структуры соединений с различным типом активности. Так, бензодиазепиновый фрагмент, имитирующий реверсивный поворот (схема 9), был использован для создания соединений с различными видами активности, как агонистической, так и антагонистической [61].



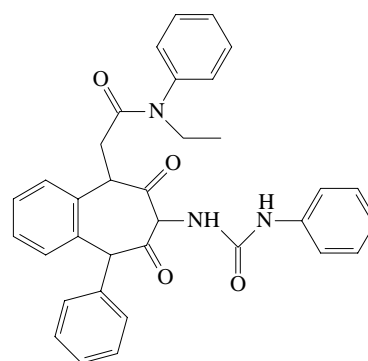
ССК антагонист



NK-1 антагонист



ВП антагонист



ССК агонист

Схема 9. Бензодиазепины и родственное соединение как часть агонистов и антагонистов

Инверсоаналоги: замена *L*-аминокислот на *D*-аминокислоты

Замена *L*-аминокислот на *D*-аминокислоты часто используется при поиске активных аналогов. Известно, что высокоорганизованные живые организмы синтезируют белки, состоящие из *L*-аминокислот. *D*-Аминокислоты встречаются часто в бактериальных пептидах. Уже более 50-ти лет тому назад было показано, что среди них встречаются пептиды, имеющие в своем составе *D*-аминокислоты, в частности, это был тироцидин и грамицидин [62]. Вторая группа пептидов, содержащих *D*-аминокислоту, — это пептидные антибиотики (лантибиотики), они были открыты в 1970-х гг. [63]. В 1981 г. был описан опиоидный пептид, выделенный из кожи южно-американской древесной лягушки *Phyllomedusa sauvagei* [64]. Это был гептапептид дерморфин, содержащий N-концевую последовательность Туг-*D*-Ala-Phe. Пептид имел высокую селективность к опиатным рецепторам μ -типа при инъекции в мозг крыс и мышей. Его анальгетическая активность было в 1000 раз выше, чем эффективность морфина, и отличалась длительностью действия. Еще несколько дополнительных пептидов, содержащих *D*-метионин и *D*-лейцин были выделены из кожи лягушек *Phyllomedusa* [65]. Некоторые из них напоминали дерморфин по биологической активности, а такие как дельторфины (deltorphins) были высокоселективны по отношению к δ -рецепторам. Относительно недавно антимикробные пептиды бомбинины Н (bombinins Н) были выделены из кожи вида лягушек *Bombina vanegata* [66]. Некоторые из этих пептидов содержат *D*-алло-изолейцин вместо изолейцина. Несколько пептидов, содержащих *D*-аминокислоты, были выделены из беспозвоночных, например фулицин (fulicin) и ачатин (achatin) из нервных узлов улитки содержат *D*-аспарагин и *D*-фенилаланин, соответственно [67]. Эти пептиды имеют различные функции, единственное, что их объединяет — это то, что во втором положении находится *D*-аминокислота. Однако и это не общее правило. Гипогликемический пептид из двух видов ракообразных (*Crustaceans*) известен в двух вариантах с *L*- или *D*-фенилаланином в третьем положении [68]. Другой пример не менее интересен. Яд паука *Agelenopsis aperta* содержит пептиды, которые парализуют жертву. Два из этих токсинов — ω -агатооксины (ω -agatoxins IVC и IVB) являются диастереомерами, а не энантиомерами. *D*-Ser(46)-содержащий диастереомер образуется из первоначально синтезированного *L*-Ser(46)-содержащего диастереомера при действии на него недавно открытого фермента пептидиламинаоцил *L*-*D*-изомеразы.

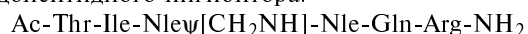
Присутствие *D*-аминокислотных остатков в пептидах может служить нескольким целям. Введением *D*-аминокислот может быть образована новая трехмерная структура. Например, было показано, что последовательность Туг-XXX-Phe в дерморфине и дельторфине имеет сэндвич-подобный II' β -поворот, в котором боковые группы *D*-аминокислот находятся между двумя ароматическими кольцами [69]. Этот фрагмент важен для связывания с энкефалиновыми рецепторами таким же образом, как это делает N-аминокислотная последовательность Туг-Gly-Gly-Phe энкефалинов. Подобная конформация была найдена с помощью рентгеноструктурного анализа для

Gly-*D*-Phe-Ala последовательности ачатина I (achatin I) [70]. Следовательно, иногда возможно замещением *L*-аминокислоты или глицина на *D*-аминокислоту стабилизировать тот или иной тип конформации в коротком пептидном фрагменте.

D-Аминокислотные остатки могут модулировать биологическую активность пептида увеличением биологического разнообразия, кодированного одним геном. Например, время действия двух вариантов гипергликемического гормона из омара различно для *L*- и *D*-фенилаланиновой формы [68]. Активность двух агатоксинов различается в зависимости от хиральности серинового остатка: *D*-изомер в 3 — 5 раз более активен, чем *L*-изомер. И наконец, в связи с тем, что большинство ферментов энантиоспецифичны, аналог, содержащий *D*-аминокислоту, может быть более стабилен по отношению к действию ферментной атаки, имея более продолжительный полупериод жизни. Это связано с тем, что пептидная связь рядом с таким остатком не гидролизуется большинством экзо- и эндо-пептидаз, в то время как большинство биологически активных пептидов гидролизуются под действием ферментов всего за несколько минут. Пептиды, содержащие *D*-аминокислоты, как правило гораздо более стабильны. Например, быстрый ферментативный гидролиз энкефалинов может быть заторможен замещением глицина-2 на *D*-аланин [71].

Подход в виде точечных замен природных *L*-аминокислот на *D*-аминокислоты достаточно давно используется в пептидной химии. *D*-Аминокислоты часто используются для получения аналогов, содержащих один или несколько аминокислотных остатков в неприродной стереоконфигурации. Как результат, было получено большое количество аналогов, содержащих *D*-аминокислоты с различным типом биологической активности. На первых этапах эти замены аминокислот были сделаны для того, чтобы защитить пептиды от ферментативной деградации. По-видимому, этот подход впервые встретился в работе Заорала [22]. Замена отдельных аминокислот, тем более в сочетании с другими модификациями, довольно часто приводила к получению более активных агонистов или антагонистов. Однако попытки поменять все *L*-аминокислоты в гормонах на их *D*-изомеры к положительному результату не могли бы привести. Объяснение этому пришло позднее, когда были получены два энантиомерных фермента (HIV-1 протеаза), состоящие полностью из *L*- и, соответственно, *D*-аминокислот [72]. Физико-химические свойства фермента, построенного из *D*-аминокислот оказались идентичными таковым фермента, построенного из *L*-аминокислот, включая и время задержки при обращенно-фазовой ВЭЖХ. Отличия были выявлены при измерении спектров КД. Ферменты вели себя как истинные энантиомеры, показав одинаковое оптическое вращение, но с противоположным знаком, иными словами пространственная структура ферментов являлась зеркальным отражением друг друга (рис. 1). При изучении ферментативной активности двух энантиомерных форм фермента было показано, что их активность практически равна, но *L*-фермент расщепляет только *L*-субстрат, в то время как *D*-фермент расщепляет только *D*-субстрат.

Аналогично, энантиомеры (*D*- и *L*-структуры) псевдопептидного ингибитора:



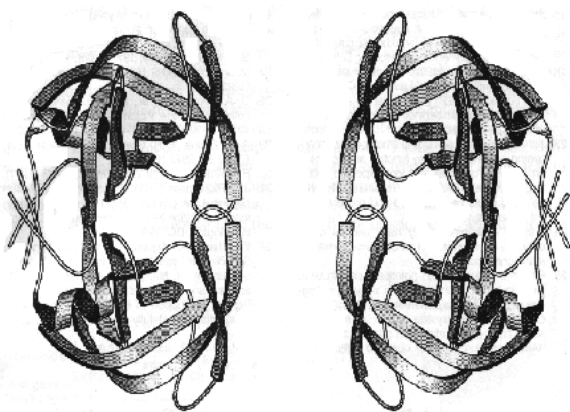


Рис. 1. Энантиомерные формы HIV-1 протеазы

действовали на *D*- и *L*-формы фермента, соответственно. Интересно, что ахиральный ингибитор тормозил действие обеих форм фермента одинаково. Из данных по ферментативному расщеплению энантиомерных форм фермента следует, что *D*-форма фермента может оказаться чрезвычайно устойчивой против биодеградирующего фермента в *L*-форме.

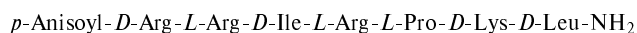
Интересным примером использования принципа точечных замен аминокислот в пептидном гормоне на их энантиомеры является история поиска активного фрагмента динорфина А (впервые изолированного из свиного гипофиза), ответственного за противовоспалительную активность [73]. Динорфин А является 17-членным пептидом: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln, имеющим в N-концевой части последовательность Leu-энкефалина (Tyr¹-Gly-Gly-Phe-Leu⁵). Вначале это заставило отнести этот пептид к эндогенным лигандам опиоидных рецепторов [74]. Удаление Tyr¹ из динорфина А приводило к потере как опиоидной активности, так и способности выступать в роли антагониста опиоидных рецепторов [75]. В то же время было показано, что динорфин А способен подавлять воспалительный процесс при тепловом повреждении тканей (эдема) [76]. Активность полноразмерной молекулы динорфина А в тесте подавления термически индуцированной эдемы в лапах анестезированных крыс соответствовала ED₅₀ = 1,7 мг/кг (внутривенно). Ряд укороченных аналогов динорфина А был получен и исследован в тесте подавления эдемы, индуцированной нагреванием. В результате было найдено, что последовательность 6–12 динорфина А: Arg⁶-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu¹² может быть тем активным центром, который ответственен за этот биологический эффект [77]. Дальнейшая модификация этого фрагмента позволила выбрать базовый пептид для последующей модификации. Им оказался гептапептид:



содержащий на N-конце остаток *para*-метоксибензойной кислоты (*p*-Anisoyl), а на C-конце — *D*-лейциламидный фрагмент. Гептапептид имел активность ED₅₀ = 0,18–0,20 мг/кг (внутривенно). Аланиновое сканирование и сканирование в результате замены природных аминокислот на их N-Ме-аналоги, что приводит обычно к ограничению подвижности пеп-

тидной цепи вблизи N-Ме аминокислот и закреплению определенной конформации пептидов [78], показало, что замена Arg⁷ и Leu¹² приводит к неактивным аналогам, в то время как замена Ile⁸ практически на активность не влияет. Обращает на себя внимание тот факт, что как аланиновое сканирование, так и сканирование N-Ме аминокислотами не позволило найти аналог гептапептида, более активный, чем исходный пептид сравнения [77]. Столкнувшись с проблемой невозможности дальнейшей оптимизации структуры гептапептида *p*-Anisoyl-Tyr⁶-Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-*D*-Leu¹²-NH₂ с использованием обычно применяемых подходов (аланиновое и N-метиламинокислотное сканирование), и с учетом данных по точечным заменам *L*-аминокислот в биологически активных пептидах на их *D*-формы было решено провести диастереомерное сканирование данной последовательности, по существу, применив подход, обычно реализуемый при использовании принципов комбинаторной химии — принцип пептидных библиотек.

Принцип определения хиральности аминокислот в каждой отдельной позиции фрагмента 6–12 динорфина А достаточно прост [79]. Хиральность аминокислот в каждой позиции пептида была определена при пошаговом синтезе аналогов этого пептида с C-конца последовательной заменой каждой аминокислоты на соответствующие энантиомеры (*L*- и *D*-аминокислоты). Исходный пептид содержал на C-конце *D*-лейцин, поэтому на первом этапе с использованием ТФ метода были синтезированы два аналога пептида, содержащие во втором положении (с C-конца) *L*- или *D*-лизин. В остальные позиции пептида вводили соответствующие *D,L*-аминокислоты. После биологических испытаний двух синтезированных пептидов был выбран вариант, показавший лучшую активность (см. табл. 1). В данном случае это был *D*-лизин. На следующем этапе за основу был взят дипептид *D*-Lys-*D*-Leu, из которого были получены два конечных пептида, содержащих в третьей позиции (с C-конца) *L*- и *D*-пролин, а другие аминокислоты, стоящие левее пролина, использовали в *D,L*-форме. После биологических испытаний двух аналогов был отобран более активный вариант, имеющий *L*-пролин. Пошаговый отбор *L*- или *D*-аминокислот во всех позициях дал возможность получить оптимальную структуру соединения. Это был аналог фрагмента динорфина А последовательности 6–12, имеющий структуру:



Его активность в три раза превосходила активность исходного пептида сравнения *p*-Anisoyl-Arg⁶-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-*D*-Leu¹²-NH₂ и почти в 30 раз активность дез-Tyr¹-динорфина А.

Разработанный нами подход можно рассматривать в определенном смысле как один из вариантов использования методов комбинаторной химии для поиска аналогов биологически активных пептидов с оптимальной биологической активностью путем замены *L*-аминокислот на их энантиомеры, *L*- и *D*-аминокислоты. Однако этот подход, в отличие от принципа пептидных библиотек, имеет свои особенности. Он отличается от принципа «классических» пептидных библиотек тем, что на стадии синтеза получают соединения, имеющие в одной и той же позиции одина-

Общий вывод из первого этапа работ с ретроинверсопептидами состоял в том, что селективная ретроинверсомодификация, включая концевые группы пептидов, часто давала аналоги, сохраняющие определенную активность и более устойчивые к протеолизу. Однако в создании антигенов, в частности, для искусственных вакцин, ретроинверсо- и энантиомерные аналоги нашли более интересное применение [88].

Поиск активных фрагментов полипептидных гормонов по принципу удаления отдельных аминокислот или олигопептидных фрагментов

Этот подход применяется к достаточно сложным полипептидным гормонам, содержащим в своем составе олигопептидные фрагменты, удаление которых не отражается на определенном виде биологической активности, или если в полипептидном гормоне имеются фрагменты, ответственные за различные виды биологической активности. Примером подобного подхода являются исследования по поиску «активного» центра кальцитонина лосося, ответственного за анальгетическую активность неопиоидного типа [89]. В результате сканирования первичной структуры гормона, был найден фрагмент 16—21 кальцитонина лосося, активность которого в эпилептогенном (и формалиновом) тесте на новорожденных крысах приближалась к активности полноразмерного гормона. Другой пример обсуждался выше — поиск противовоспалительного фрагмента динорфина А.

Еще одним примером является поиск укороченных аналогов рилизинг-фактора гормона роста человека [GHRF(1-44)NH₂] [90]. Удаление из 44-членной аминокислотной последовательности рилизинг-фактора гормона роста человека 23-членного С-концевого фрагмента приводит к GHRF(1-21)NH₂, отщепление от которого с N-конца еще трех аминокислот дает в результате октадекапептид GHRF(3-21)NH₂, обладающий полной биологической активностью гормона. Применимость подобного подхода хорошо видна на примере поиска укороченных аналогов гастринина. При изучении С-концевого фрагмента гастринина Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, обладающего, в принципе, всеми физиологическими функциями полноразмерной молекулы гастринина, однако значительно уступающего ему по глубине эффекта, были получены аналоги этого тетрапептида по аминокислотной группе. В серии аналогов гастринина Pyy-(Glu)_x-Ala-Trp-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂ (x = 0, 1, 2, 3, 4) было показано, что включение трех остатков глутаминовой кислоты позволяет иметь аналог по активности сравнимый с минигастрином [91]. По-видимому, «кислая» область гастринина несет добавочную информацию об узонавании гастрининовых рецепторов или обеспечивает его направленный транспорт. В то же время удаление из природного гастринина С-концевого фенилаланина дает аналог, способный полностью ингибировать связывание меченного гастринина человека с его рецепторами [92]. В холецистокининине был выделен гептапептид Ac-ССК-7 (Ac-Tyr(SO₃H)²-Met³-Gly⁴-Trp⁵-Met⁶-Asp⁷-Phe⁸), оказавшийся самой короткой последовательностью, дающей биологический отклик. Замена глицина-4 в нем на D-аланин приводит к аналогу с пролонгированным действием [93].

Стабилизация амфипатической α-спирали в пептидах

Достаточно нетрадиционный подход оптимизации биологических свойств пептидных гормонов в применении к большим полипептидным гормонам начал формироваться в начале 1980-х гг. как результат понимания важности в функционировании пептидов и белков амфипатической (амфифильной) α-спиральной конформации [94, 95]. В настоящее время известно, что амфипатические α-спиральные участки принимают непосредственное участие в образовании комплексов, таких, например, как гормон-рецептор, антиген-антитело, при слиянии вируса с клеткой хозяина и т.д.

Часто мембраноактивные фрагменты белков вирусов являются α-спиральными и амфипатическими [96, 97], что облегчает их слияние с соответствующими амфипатическими фрагментами белков клеток хозяина при вирусном заражении. Поэтому подход, связанный с получением соединений со стабилизацией в них амфипатических α-спиральных структур, способствующих оптимизации связывания и усилению взаимодействий реагирующих объектов, в настоящее время широко применяется при создании, например, носителей биологически активных веществ, в частности, носителей ДНК, обеспечивающих их целевой транспорт [98—101].

Понимание важности и вклада взаимодействия амфипатических α-спиральных структур гормона и соответствующего рецептора привело к разработке нового подхода к получению более потенциальных аналогов гормонов. Были получены, например, аналоги глюкагона — [Glu²¹]-глюкагон и [Lys^{17,18},Glu²¹]-глюкагон с целью выяснения возможности стабилизации амфипатической α-спиральной конформации на С-конце глюкагона и получения более активного соединения [102]. Оказалось, что 3-х и 5-кратное увеличение рецептор-связывающей активности совпадало с увеличением содержания в пептидах α-спиральной конформации. Однако дополнительное замещение в области 10-13 глюкагона в случае [Phe¹⁰, Lys^{17,18}, Glu²¹]-глюкагона и [Phe^{10,13},Lys^{17,18},Glu²¹]-глюкагона снижало рецепторную активность. По-видимому N-концевой фрагмент глюкагона не входит в амфипатическую α-спираль и не принимает участие в создании продуктивного комплекса гормон-рецептор.

Получение аналогов гормонов модификацией функциональных групп гормонов низкомолекулярными или высокомолекулярными соединениями

Практически одновременно с началом работ по химическому синтезу пептидных гормонов и изучению связи структура—активность и в результате синтеза их разнообразных аналогов (как путем замены аминокислот или их модификации, так и в результате создания пептидомиметиков) стал разрабатываться альтернативный подход. Он заключался в модификации различных групп гормонов низкомолекулярными или высокомолекулярными соединениями и имел целью получение аналогов с улучшенными физико-химическими и биологическими характеристиками. В этом случае пептидный гормон не синтезировался, а использовался в виде выделенного из природных источников.

Особый интерес к инсулину в 50-х—60-х годах XX века был не случаен. До создания генно-инженерного человеческого инсулина оставалось еще очень много времени, а интерес к его применению резко возрос. Инсулин является белковым гормоном, который синтезируется в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы и используется организмом для поддержания гомеостаза глюкозы и других углеводов, а также участвует в метаболизме липидов. Он был впервые выделен в 1921—1922 гг. Ф.Г. Бантингом и Ч.Х. Бестом из поджелудочной железы свиньи и почти сразу же был использован для лечения инсулинзависимого диабета, что по праву является одним из основных достижений медицины XX века. Его полная аминокислотная последовательность была определена в начале 1950-х г. Сэнгером, а пространственная структура кристаллического гормона была установлена Адамсом в 1969 г. В период 1963—1966 гг. в ряде лабораторий были проведены частичные синтезы инсулина с использованием классического и твердофазного методов, и основная проблема при его получении возникла на стадии соединения цепей А и В [103, 104]. Однако инсулин, как и все другие пептидные гормоны, разрушается в организме после введения в течение нескольких минут ферментными системами организма, а его пролонгированные формы появились сравнительно недавно. В то же время структуры инсулинов свиньи и человека почти идентичны. Единственное отличие состоит в том, что в инсулине человека в положении В30 находится треонин, а в инсулин свиньи в этой позиции находится аланин. Принимая во внимание, что свиная поджелудочная железа (и инсулин из нее) была достаточно доступна, например, из 8000 фунтов поджелудочной железы на мяскокомбинатах можно получить один фунт инсулина свиньи, а также то, что химический синтез инсулина человека в больших количествах в то время был достаточно проблематичен (полный химический синтез был осуществлен в 1974 г. [6]), то проводились исследования по разработке двух принципиально отличных подходов к замедлению метаболизма инсулина. В основе их лежала идея модификации готового, природного инсулина. Первый подход состоял в разработке метода превращения инсулина свиньи в инсулин человека [105], второй — в разработке метода модификации инсулина свиньи полимерами с целью подавления его иммуногенности при сохранении активности.

К настоящему времени можно выделить три основных пути получения полимерных производных гормонов (рис. 2).

Полиаминокислотные и олигоаминокислотные конъюгаты инсулина

Пионерскими в этом направлении исследований следует считать, по-видимому, работы по прививке различных полипептидных цепей к аминокислотам инсулина в результате полимеризации на них, как иницирующих группах, N-карбоксихидридов аминокислот (рис. 2, путь *в*) [106, 107]. Позднее этим же способом был получен олиго-L-глутамилинсулин [108]. Основным недостатком данного подхода было то, что к инсулину, как правило, присоединялись короткие олигомерные цепочки, так как полимеризация N-карбоксихидридов аминокислот проводилась в

воде, и преобладающим процессом был гидролиз ангидрида. Конечный продукт состоял из набора близких по молекулярной массе и свойствам пептидилину-сулинов, из которых было трудно выделить индивидуальные соединения с целью сопоставления структуры и активности.

Поэтому был рассмотрен альтернативный путь получения пептидилину-сулинов — модификацией инсулина заранее синтезированными и активированными по С-концевой карбоксильной группе олигопептидами [109] (рис. 2, путь *б*). Производные гормона в этом случае могут быть рассмотрены как «звездообразные» конъюгаты, так как в них модифицирующий олигопептид связан с модифицируемым гормоном однооточечно. Этот подход был более продуктивен с точки зрения изучения связи структура—активность, потому что позволял более надежно контролировать структуру модифицирующих инсулин олигопептидов. В результате модификации инсулина защищенными по боковым группам и активированными по С-карбоксильному концу олигомерами глутаминовой кислоты и лизина (для модификации использовали олигомеры вплоть до степени олигомеризации 4) удалось в определенной степени определить реакционную способность аминокислот инсулина. Оказалось, что реакция инсулина с защищенными аминокислотами даже при большом избытке модификатора проходит прежде всего по двум группам — по α -аминогруппе глицина-1

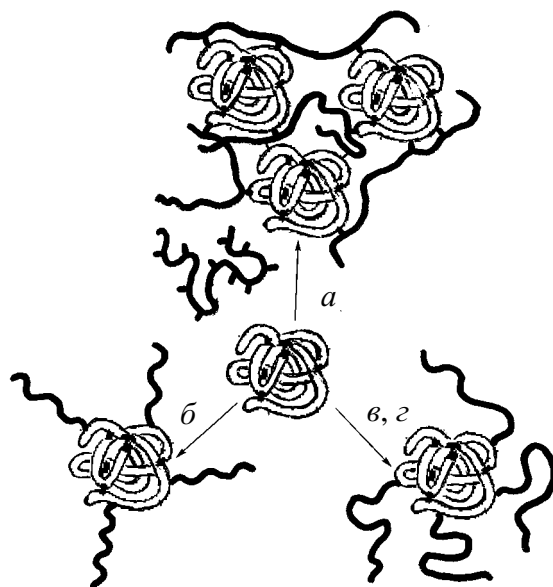


Рис. 2. Пути получения полимерных производных инсулина:

a — взаимодействие с заранее полученным и активированным по боковым группам полимером; *б* — взаимодействии с заранее полученными и активированными по С-концевой группе пептидным полимером/олигомером или ПЭГ; *в* — прививка полипептидов полимеризацией N-карбоксихидридов аминокислот; *г* — первый этап — модификация аминокислот инсулина диметилимидатом или диазидом 2,2'-азоизомасляной кислоты с образованием «макроинициатора» на основе инсулина, второй этап — полимеризация винильных мономеров на «макроинициаторе»

(цепь А) и ϵ -аминогруппе лизина-29 (цепь Б). В то же время взаимодействие инсулина с олигомерами (димерами—тетрамерами) тех же аминокислот приводит к модифицированному в трех точках производным инсулина (по двум α -аминогруппам инсулина цепей А и Б и ϵ -аминогруппе лизина цепи Б-29). Различие объясняется разворачиванием структуры инсулина после введения одного-двух остатков олигопептидов, которое приводит к большей доступности α -аминогруппы труднее модифицируемого фенилаланина Б-1.

Изучением дисперсии оптического вращения было найдено, что введение олигомеров лизина в инсулин приводит к увеличению степени α -спиральности гормона (стабилизации пространственной структуры) при рН 10,5 и снижению α -спиральности (дестабилизации пространственной структуры вследствие протонирования аминогрупп) при рН 3,1. В этом случае дестабилизация структуры инсулина мало зависит от длины олигомерных цепочек. В то же время модификация инсулина олигомерами глутаминовой кислоты приводит к дестабилизации пространственной структуры как при рН 10,5, так и при рН 1,2, причем увеличение длины олигомерных цепочек приводит к усилению эффекта дестабилизации пространственной структуры. При изучении биологической активности олигопептидилинулинов (тест — изменение содержания глюкозы в крови кроликов) было показано, что модифицированные инсулины, в которых наблюдается стабилизация пространственной структуры (модификация олигомерами лизина) имеют активность, сравнимую с активностью исходного инсулина, и определенную склонность к пролонгации действия. В случае инсулина, модифицированного олигомерами глутаминовой кислоты, наблюдается падение активности. Этот подход, по-видимому, можно рассматривать как вариант стабилизации вторичной структуры гормона, выполненный не путем усиления амфипатической α -спиральности гормона после замены в α -спиральном участке некоторых аминокислот, как это было показано, на глюкагоне (см. ранее), а в результате модификации N^α-аминогрупп гормона α -спиральобразующими олигопептидами, способными стабилизировать α -спиральные участки гормона, сближенные с ними в пространстве (эффект «близкодействия») [110].

Карбоцепные полимерные производные инсулина и его конъюгаты с полиэтиленгликолем

Целью нового этапа работы с инсулином, начатого в середине 1970-х годов, была разработка общего способа модификации гормонов и белков карбоцепными полимерами с целью их стабилизации, подавления иммуногенности, обеспечения возможности целевой доставки к месту действия и контролируемого выделения при сохранении биологической активности. Выяснилось, что наиболее интересными являются два подхода, связанные с получением так называемых «звездообразных» карбоцепных полимерных конъюгатов (рис. 2, путь *в*) и «звездообразных» полиэтиленгликолевых конъюгатов (рис. 2, путь *б*), в которых модифицирующий карбоцепной или гетероцепной полимер одноточечно и одним своим концом связаны с модифицируемым гормоном.

Комбинация в полимер-белковом конъюгате двух компонентов — белковой составляющей и карбоцеп-

ного полимера — позволяет получать соединения с принципиально новыми, направленно регулируемые свойствами [111, 112]. Особенностью полимерных конъюгатов белков является то, что карбоцепные полимеры-модификаторы в них не являются биодеградирующими соединениями и стабильны по отношению к денатурирующим воздействиям, например, гидролитических ферментов организма. Поэтому они хорошо защищают белковые молекулы, связанные с ними, от действия этих ферментов. В то же время карбоцепные полимеры-модификаторы, как правило, неиммуногенны и могут экранировать антигенные пептидно-белковые участки, снижая вероятность иммунной инактивации белкового компонента. Весьма важно, что второй компонент конъюгата — белок — является биодеградирующим. Комбинация в одном соединении, в «звездообразных» карбоцепных полимерных конъюгатах, преимуществ биодеградируемого «ядра» — белкового компонента, имеющего определенный вид биологической активности (например, гормональной или ферментативной) и способного специфически связываться с определенными рецепторами на клетках, и неиммуногенного и фермент-устойчивого карбоцепного полимера позволяет получить соединения с уникальными свойствами. Для синтеза карбоцепных полимерных конъюгатов пептидных или белковых гормонов можно было использовать разработанный еще в 1950—1960-е гг. подход (рис. 2, путь *а*), связанный с применением полимеров, содержащих в боковых фрагментах полимера различные заранее активированные функциональные группы (карбоксылные, способные активироваться в присутствии карбодиимида, сложноэфирные активированные, ангидридные и т.д.). К недостаткам подобного подхода следует отнести то, что при взаимодействии полиактивированного полимерного реагента с полифункциональным реагентом — белком в принципе невозможно получить конъюгаты определенных по составу и молекулярным массам. В этом случае происходит многоточечное связывание реагирующих компонентов, что приводит к сложной смеси конъюгатов переменного состава с неконтролируемой молекулярной массой, структурой и биологической активностью [113]. Поэтому уже давно делались попытки избежать многоточечности связывания модифицирующего полимера с модифицируемым белком. Удачным примером этого является рассмотренный выше подход, заключающийся в прививке к белку полипептидов в результате полимеризации N-карбоксиигидридов аминокислот на аминогруппах белка как инициаторах полимеризации [107, 108] (рис. 2, путь *в*) или метод «пришивки» заранее полученных и активированных по С-концу олигопептидов [109] (рис. 2, путь *б*).

Другим удачным примером «звездообразных» полимерных конъюгатов можно считать модификацию белков полиэтиленгликолем, содержащим на одном из своих концов активированную группировку (рис. 2, путь *б*) [114]. В связи с определенными преимуществами «звездообразных» карбоцепных полимерных конъюгатов белков в последние годы интерес к ним значительно возрос. Разработанный в последние годы подход для их получения включает предварительный синтез низкомолекулярных карбоцепных олигомеров, содержащих на одном

из своих концов активированную карбоксильную группировку, и их ковалентное связывание с белком [115—119]. Синтез карбоцепных олигомеров включает полимеризацию винильных мономеров с помощью инициатора — 2,2'-динитрила аза-изомасляной кислоты в присутствии тиогликолевой кислоты, которая выступает в роли обрывателя полимеризации и позволяет вводить в состав карбоцепных олигомеров карбоксильную группу. Последняя далее превращается в активированный эфир в присутствии карбодиимида и N-гидроксисукцинимиды, что позволяет связывать олигомеры с белком односторонне [117]. (Синтез по аналогии со схемой, рис. 2, путь б.)

Однако общий способ синтеза «звездообразных» карбоцепных полимерных конъюгатов белков, в том числе и гормона инсулина, с односторонним связыванием модифицирующего полимера с модифицируемым белком был разработан нами еще в конце 1970-х—начале 1980-х гг. [112, 120—124]. На первом этапе синтеза «звездообразных» карбоцепных конъюгатов белков исходные белки модифицируют диметилмидамом или диазидом 2,2'-азо-бисизомасляной кислоты — производными динитрила 2,2'-азо-бисизомасляной кислоты, являющегося известным инициатором радикальной полимеризации винильных мономеров. Полученные таким образом «макроинициаторы» на основе белков используют на втором этапе для полимеризации винильных мономеров с образованием полимер-белковых конъюгатов, в которых карбоцепной полимер односторонне связан с белком одним своим концом (рис. 2, путь з).

С использованием разработанного подхода были получены «звездообразные» карбоцепные полимерные

конъюгаты гормона инсулина. В качестве модифицирующих полимеров выступали поли-N-винилпирролидон, поли-N-винилимидазол, полиакриловая кислота и полиакриламид.

Преимущества «звездообразных» карбоцепных полимерных конъюгатов белков по сравнению с конъюгатами, полученными при использовании заранее активированных полимеров, выявились при изучении их физико-химических и биологических свойств. Так, была показана возможность значительного уменьшения иммунорективности белкового компонента конъюгата (вплоть до полного ее исключения) при сохранении значительной доли гормональной активности до 95% (см. табл. 2).

В опытах *in vitro* было показано, что в результате изменения химической природы модифицирующего полимера имеется возможность регулирования времени «жизни» конъюгата в условиях его деградации протеазами (см. табл. 3). Это может быть достигнуто уже при прививке к белку полимерных цепей с молекулярной массой 3—5 кДа, что имеет особое значение при создании именно биодеградирующих карбоцепных полимерных конъюгатов биологически активных соединений. После выполнения конъюгатом своей функции и разрушения белковой составляющей ферментами организма низкомолекулярные карбоцепные полимерные фрагменты с молекулярными массами ниже 30 кДа быстро выводятся из организма через почки.

При выполнении синтеза полимер-белковых конъюгатов, для которых желательно регулировать время «жизни» в организме, следует учитывать изоэлектрическую точку выбранной гидролазы (в данном случае это был трипсин с pI 9,6) и общий заряд поли-

Таблица 2

Биологические свойства «звездообразных» карбоцепных полимерных конъюгатов инсулина

В обозначениях конъюгатов инсулина даны точки модификации — номера аминокислот в А и В цепях инсулина, и краткие названия модификаторов

«Звездообразные» карбоцепные полимерные конъюгаты инсулина и соединения сравнения	Молекулярная масса модификатора, кДа	Биологическая активность	
		Уменьшение уровня глюкозы в крови кроликов, %	Иммунореактивность, %
Инсулин	—	100	100
A1, B29-AIB*	0,2	100	44
A1, B29-PVI	1,5	150	1,5
A1, B29-PVI	14	45	0,5
A1, B29-PVP	3	70	2,0
A1, B29-PVP	6	50	0
A1, B29-PAA	4	80	2,5
A1, B29-PAA	10	48	0,2
A1, B29-PA	2,5	56	3,5
A1, B29-PA	12	20	0
B1-PVI	1	95	5
B1-PVI	8	70	1,3
B1-PAA	5	65	3,0
B29-PVI	2	—	3,2
B29-PVI	6	—	2,0
B29-PAA	10	—	1,2
A1, B1, B29-PVI	4	0	0
A1, B1, B29-PAA	11	40	2,4

* двучленно модифицированный по положениям A1, B29 2,2'-азо-бисизобутириллинсулин (внутримолекулярно сшитый); PVI — поли(N-винилимидазол); PVP — поли(N-винилпирролидон); PA — полиакриламид; PAA — полиакриловая кислота

Таблица 3

Кинетические данные по гидролизу трипсином A1, B29-дизамещенных «звездообразных» карбоцепных конъюгатов инсулина

В обозначениях конъюгатов инсулина даны точки модификации — номера аминокислот в А и В цепях инсулина, и краткие названия модификаторов

«Звездообразные» карбоцепные полимерные конъюгаты инсулина и соединения сравнения	Молекулярная масса модификатора, кДа	$K_m(\text{каж.}) \cdot 10^6$	$V_{max} \cdot 10^{10}, \text{ моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-2}$
Инсулин	—	4500	1,9
A1, B29-AIB*	0,2	2200	3,1
A1, B29-PVI	0,6	3500	3,2
A1, B29-PVI	10	2000	1,4
A1, B29-PVI	14	6300	4,1
A1, B29-РАА	4	1,8	1,8
A1, B29-РАА	6	6,6	2,5
A1, B29-РАА	8	5,4	0,8
A1, B29-PVP	6	1,3	2,8
A1, B29-PVP	22	3,8	1,0

* Двухточечно модифицированный по положениям A1, B29 2,2'-азо-бис-изобутириллинсулин (внутримолекулярно сшитый). PVI — поли(N-винилимидазол); PVP — поли(N-винилпирролидон); РА — полиакриламид; РАА — полиакриловая кислота

мер-белкового конъюгата. Для быстрого гидролиза инсулина (между аргинином B-22 и глицином B-23) полиакриловые конъюгаты инсулина более выгодны (уменьшение константы Михаэлиса—Ментен) из-за электростатического сближения реагентов по сравнению с поли(N-винилимидазолями) конъюгатами инсулина (увеличение константы Михаэлиса—Ментен на три порядка), для которых характерно электростатическое отталкивание реагирующих компонентов (и фермент и полимер-инсулиновый конъюгат несут одинаковый заряд, являясь поликатионами).

К наиболее значительным преимуществам «звездообразных» полимерных конъюгатов белков можно отнести возможность введения модифицирующих полимерных цепей по определенным группам инсулина, что важно при получении более активных конъюгатов. Так, были получены конъюгаты, содержащие полимерные фрагменты, связанные с одной (A1), двумя (A1, B29) и тремя (A1, B1 и B29) аминокислотами. При этом имеется возможность регулировать не только

число полимерных цепей и точки их связывания с инсулином, но и использовать модифицирующие полимеры различной молекулярной массы.

В результате было показано, что положительный «полимерный» эффект, полученный в результате прививки к белковому компоненту карбоцепных полимерных цепей, может быть связан, например, со стабилизацией инсулина, снижением его иммунореактивности (табл. 2) и возможностью регулирования времени действия ферментов (табл. 3) при сохранении достаточно высокого уровня биологической активности.

Дополнительное преимущество «звездообразных» карбоцепных полимерных конъюгатов гормонов связано с возможностью подавления иммуногенных свойств гормонов. Это важно, если их далее использовать как источник гормональной активности, например, инсулина (см. далее) или как конъюгат, обеспечивающий направленный транспорт, например, ДНК, за счет гормональных рецепторов на соответствующих клетках (см.

далее). В работе [125] это было продемонстрировано на примере синтеза и изучения «звездообразных» полимер-белковых конъюгатов на основе бычьего сывороточного альбумина (BSA) и связанных с ним карбоцепных сополимеров, содержащих в полимерной части конъюгатов гормон брадикинин (табл. 4).

Иммунизацией кроликов конъюгатами и изучением антисывороток было показано, что прививка к белку сополимеров на основе N-винил-2-метил-имидазола и акролеина позволяет значительно снизить выработку антител как против белкового компонента носителя (BSA), так и гормона брадикинина, присоединенного к карбоцепной составляющей конъюгата. В то же время, введение в карбоцепную часть конъюгата полиметакриловой кислоты усиливает иммунный ответ в результате проявления адьювантных свойств полиметакриловой кислоты.

Преимущества «звездообразных» полимерных конъюгатов, полученные на примере «звездообразных»

Таблица 4

Титр антител против брадикинина и бычьего сывороточного альбумина

Иммуноген	Титр антител			
	Иммунизация с адьювантом Фрейнда		Иммунизация без адьюванта Фрейнда	
	Антигены		Антигены	
	BK-Ova***	BSA	BK-Ova***	BSA
Poly(MAA _k , DEAA _l , BK _h)-BSA(Suc)	5120	102400	320	2560
Poly(VP _k , DEAA _l , BK _h)-BSA(Suc)	2560	3200	—*	160
Poly(VMI _k , DEAA _l , BK _h)-BSA(Suc)	40	640	—**	—**
BK _h -BSA(Suc)	2560	6400	320	2560

BK — брадикинин; BSA — бычий сывороточный альбумин; VMI — N-винил-2-метил-N-винилимидазол; VP — N-винилпирролидон; MAA — метакриловая кислота, DEAA — диэтилацеталь акролеина. * Титр не определяется; ** Иммунизация не проводилась; *** Конъюгат BK-Ova получен из брадикинина и овальбумина с помощью глутарового альдегида

карбоцепных конъюгатов инсулина, были позднее практически полностью подтверждены при изучении свойств инсулина, модифицированного полиэтиленгликолем (ПЭГ). Было показано [126], что модификация инсулина по аминогруппе фенилаланина В1 активированным монометоксиполиэтиленгликолем приводит к стабилизации инсулина, тогда как эффект стабилизации в случае В29 (ϵ -аминогруппа лизина) тем же полимером был незначителен. По данным биологических испытаний модификация N-концевой части цепи В (Phe1) полимером с М 750 практически не влияет на активность гормона, тогда как пришивка полимера с М 2000 уменьшает активность до 85%. В другой работе [127] было показано, что иммуногенность ПЭГ-инсулинов (А1, В1 и/или В29) была значительно подавлена при сохранении биологической активности (монопolyмерные конъюгаты) или ее снижении (дипolyмерные конъюгаты).

При сравнении двух типов полимеромодификаторов, использованных для получения «звездообразных» полимерных конъюгатов инсулина, можно сделать вывод, что эти конъюгаты позволяют направленно регулировать свойства инсулина. Но при сравнении конъюгатов, содержащих в своем составе карбоцепные полимеры или полиэтиленгликоль, видно, что карбоцепные полимеры, одно-точечно связанные с модифицируемым гормоном, имеют одно существенное преимущество перед ПЭГ, которое в случае ПЭГ конъюгатов не может быть реализовано. Карбоцепные полимеры, связанные с пептидом или белком, позволяют ввести в полимерный фрагмент полимер-белкового конъюгата любые дополнительные количества иных биологически активных соединений, имеющих собственную активность. Так, при получении конъюгатов для иммунизации, содержащих брадикинин, в них вводили до 15 молей брадикина на моль БСА (табл. 4). ПЭГ такой возможности не дает — по второму концу полиэтиленгликолевого фрагмента в конъюгате можно ввести только одно соединение (см. далее). Другим преимуществом карбоцепных полимерных конъюгатов является их большая стабильность в организме по сравнению с конъюгатами, содержащими ПЭГ.

Изучение возможности медицинского применения пептидных гормонов и их аналогов — успехи и перспективы

Создание гормон-полимерных систем с контролируемым высвобождением гормона

Работы по получению «звездообразных» полимеринсулиновых конъюгатов имели одной из основных целей — создание биологически активных, неиммуногенных конъюгатов, способных обеспечить целевой транспорт конъюгата к месту действия. Но кроме этого предусматривалась возможность создания систем с обратной связью, способных при определенном сигнале выделять биологически активный инсулин. Так, на примере ПЭГ-конъюгатов инсулина начали изучать проблему создания систем, реагирующих на внешний

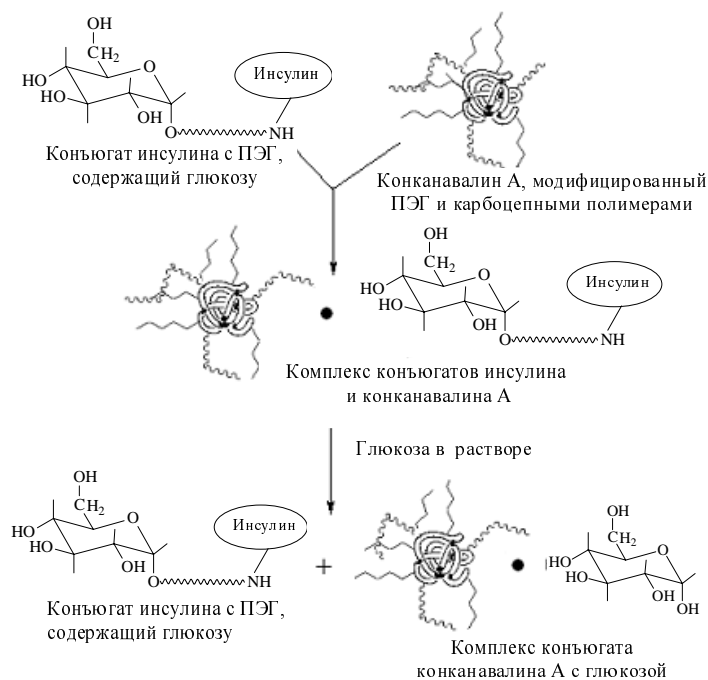


Рис. 3. Схема действия полимерного комплексного конъюгата инсулина и конканавалина А в присутствии глюкозы

сигнал и выделяющих инсулин в ответ на определенный уровень глюкозы в крови [128]. Инсулин-выделяющая полимерная система с обратной связью состояла из двух компонентов: из инсулина, модифицированного по аминогруппе фенилаланина (В1) полиэтиленгликолем, содержащем на втором конце ПЭГ-цепи глюкозный остаток, который сохраняет способность обратимо связываться в диссоциирующий комплекс со вторым компонентом системы, а именно, с конъюгатом конканавалина А. Последний состоял, в свою очередь, из конканавалина А, модифицированного сополимером N-винилпирролидона с акриловой кислотой (М 250000) и дополнительно, для придания растворимости этому конъюгату в воде, модифицированного 8 цепями ПЭГ. Предварительно было показано, что инсулин, модифицированный ПЭГ, сохраняет активность и стабильность. Отдельно было показано, что конканавалин А в полимерном конъюгате сохраняет способность связывать глюкозу как в виде конъюгата с инсулином, так и в свободном виде. Смешение двух компонентов, а именно, конъюгата конканавалина А с конъюгатом глюкозил-ПЭГ-инсулина приводит к образованию растворимого комплекса. Из этого комплекса биологически активный глюкозил-ПЭГ-инсулин выделялся полностью после прибавления глюкозы в концентрации 50—500 мкг/л. Подобная биомашина, основанная на обратимо диссоциирующем комплексе полимерных конъюгатов инсулина и конканавалина А, — один из первых примеров создания глюкозависимой системы с обратной связью, выделяющей инсулин в ответ на определенную концентрацию глюкозы в растворе (рис. 3).

Другим примером создания устройства с обратной связью, выделяющего инсулин в ответ на определенный уровень глюкозы в плазме крови, является работа Ито [129]. Устройство состояло из двух компонентов:

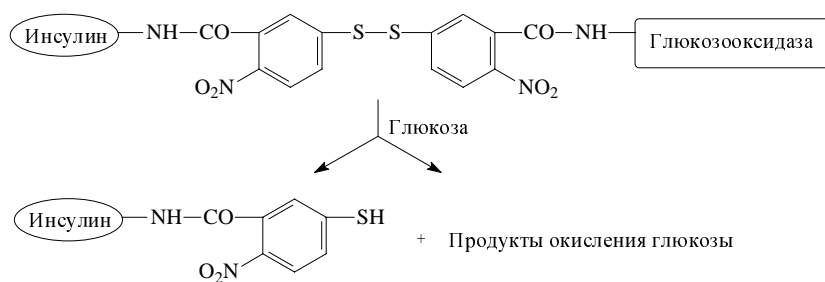


Схема 10. Взаимодействие конъюгата инсулин—глюкозооксидаза с глюкозой

из инсулина и фермента глюкозооксидазы. Оба компонента были связаны друг с другом через фрагменты 5,5'-дителиобис(2-нитробензойной кислоты) (схема 10). Предварительно было показано, что глюкозооксидаза в конъюгате сохраняла способность окислять моносахара — глюкозу, галактозу или мальтозу, а инсулин, модифицированный производным нитробензойной кислоты, также имел достаточно высокий уровень активности. Вслед за реакцией окисления глюкозы глюкозооксидазным компонентом конъюгата следовал восстановительный разрыв дисульфидной связи в спейсере, соединяющим два компонента: фермент и гормон. В результате происходил выброс инсулина, модифицированного 2-нитро-5-тио-бензойной кислотой (см. схему 10). Активность выделившегося инсулинового производного составляла 81% от активности немодифицированного инсулина — достаточно хороший результат, если принимать во внимание, что выделяющийся инсулин является модифицированным гормоном.

Пептидные гормоны как специфические лиганды в рецепторопосредованной доставке ДНК

Генная терапия — одно из быстро развивающихся направлений современной молекулярной медицины, имеющая конечной целью лечение генетически обусловленных или раковых заболеваний путем введения в организм нуклеиновых кислот [130]. Несмотря на масштабные исследования двух последних десятилетий в данной области, проблема целевой доставки гена, обладающего терапевтическим эффектом, до настоящего времени не решена, что говорит, прежде всего, о ее чрезвычайной сложности. Не вызывает сомнений, что «лучшая» система для целевого транспорта ДНК — это вирусная доставка. Миллионы лет эволюции обеспечили вирусы превосходной системой преодоления защитных механизмов клетки человека против проникновения вирусной инфекции, гарантировали доставку вирусной ДНК в клетку и ее использование для синтеза вирусных систем с применением всего арсенала воспроизводства клетки-хозяина.

Разработка подходов к лечению наследственных заболеваний, начавшаяся с попыток использования вирусов в качестве носителей генов [131], в настоящее время смещается в сторону использования синтетических невирусных векторов [132]. Основными причинами, осложняющими активное использование вирусных носителей в человеке, является, во-первых, выраженный иммунный ответ организма на неоднократное введение вирус-содержащих конструкций и, во-

вторых, опасность интоксикации продуктами их распада. Печальное сообщение из Института генной терапии университета Пенсильвании (США) о смерти 18-ти летнего пациента с наследственным дефицитом фермента орнитинтранскарбамилазы, последовавшей после введения ему рекомбинантного аденовирусного вектора, включающего ген орнитинтранскарбамилазы, произвело обескураживающий эффект на мировое сообщество [133, 134]. Данный прецедент если не отменил полностью работы в этом направлении, то существенно затормозил клинические испытания с использованием вирусных векторов (см. далее) и активизировал исследования по разработке невирусных методов доставки генного материала с использованием различного рода носителей.

Хорошо известно, что носитель, используемый для невирусной доставки гена, должен обладать следующими свойствами [135, 112]:

- обеспечивать компактизацию ДНК, за счет введения в конъюгат поликатионов (полилизин, полиэтиленимин, поли(N-винилимидазол);

- предотвращать деградацию ДНК нуклеазами крови и лизосомными ферментами клетки в результате экранирующего действия полимеров (см. выше);

- способствовать ее целенаправленному транспорту в клетки мишени за счет введения в конъюгат рецепторсвязывающих группировок (гормон инсулин, белок трансферрин, моносахариды и др.);

- обеспечивать ядерную транслокацию в результате введения в конъюгат NLS (nuclear localization system) пептидов, обеспечивающих прохождение комплекса через ядерную мембрану в ядро клетки);

- при этом система доставки должна быть нетоксичной и неиммуногенной, а входящие в ее состав компоненты должны быть биосовместимыми и биодеградируемыми.

Особое место среди перечисленных требований к носителям ДНК при ее невирусной доставке занимает проблема обеспечения целевого транспорта, что имеет прямое отношение к теме данного обзора. Впервые эта проблема была поставлена в работе 1983 г., ДНК была ковалентно связана с α_2 -макроглобулином, который обеспечил целевой транспорт ДНК в клетки, имеющие соответствующие рецепторы [136]. Однако современные представления о целевом транспорте ДНК появились позднее, когда были созданы носители, состоящие из ковалентно связанных соединений, специфически взаимодействующих, с одной стороны, с определенными рецепторами клеток, а, с другой стороны, имеющие в своем составе поликатионы, обеспечивающие нековалентное связывание ДНК с носителем [137—139]. Эти исследования, а также работы [140, 141], в которых сообщалось об использовании белков, конъюгированных с полилизином, в значительной степени способствовали пониманию основных проблем, которые необходимо было решить. Как дальнейшее развитие этих исследований было предложено использовать в качестве поликатионов, дающих комплексы с ДНК, не только полилизин, но

и другие синтетические и природные поликатионы: полиэтиленимины, протамины, гистоны, синтетические катионные липосомы. В качестве соединений, обеспечивающих целевой транспорт, кроме конъюгатов α_2 -макроглобулина [142] и трансферина [143] с полилизином применяли конъюгаты Fab-фрагментов поликлональных иммуноглобулинов с полилизином [144], интегрин, связывающий пептид с полиэтиленимином [145], белковые гормоны, модифицированные чаще всего полилизином, но и не только они. Применяли, например, конъюгаты нейротензин—полилизин [146], инсулин—*n*-ацилмочевина (инсулин, несущий поликатионный заряд, полученный в результате модификации гормона водорастворимым карбодимидом) [147] или липосомы, включающие моноклональные антиинсулиновые антитела и ПЭГ [148]. В случае использования таких носителей для целевой доставки ДНК долго оставался нерешенным вопрос о механизме процесса. В одной из работ было четко показано, что конъюгат, построенный из инсулина, модифицированного полилизином, был способен специфически доставлять ген SV-40 Т большого антигена в клетки печени действительно по механизму рецепторопосредованного эндоцитоза [149].

Пептидные гормоны как специфические лиганды в рецепторопосредованном транспорте радионуклидов для диагностики и лечения онкологических заболеваний

Доставка радионуклидов широко используется в терапии онкологических заболеваний в связи с возможностью их направленной доставки в раковые клетки как альтернатива облучения всего организма. В этой области гормоны или их аналоги нашли более широкое применение, чем при доставке, например, ДНК. Почему? В качестве носителя для доставки радионуклидов могли бы с успехом использоваться моноклональные антитела, однако для многих форм рака, за исключением, может быть, В-клеточной лимфомы [150, 151], клиническое использование радиомеченых макромолекул дает неудовлетворительные результаты в связи с невозможностью для подобных радиомеченых полимерных образований проникать в клетку и из-за сильного иммунного ответа на их введение в организм. Эти факты делают низкомолекулярные пептиды и, в частности, гормоны, более предпочтительными при решении задачи доставки радионуклидов в раковую клетку [152]. Это объясняется тем, что для большинства раковых заболеваний перерождающиеся клетки экспонируют на своей поверхности гормональные рецепторы, в «нормальных» клетках не присутствующие в столь больших количествах. В результате появляется возможность использовать клеточные гормональные рецепторы, появившиеся в избытке на раковых клетках, для выявления онкологически перерождающихся клеток и подавления их роста. Широко известный и, вероятно, первый пример этого — использование соматостатиновых рецепторов, в избытке появившихся на раковых клетках, для специфического взаимодействия с аналогами соматостатина, связанными, в свою очередь, с радионуклидами [153]. Этот подход начал активно развиваться в начале 1990-х гг., и он позволил, на первом этапе, создать новые методы визуализации раковых клеток *in vivo* с использованием радионуклидных аналогов соматостатина, специфически взаимодействующих

с соответствующими рецепторами. Положительным является то, что пептиды значительно менее иммуногенны, чем белки. Вследствие малых размеров они легче проникают в ткани и раковые клетки, время их разрушения и вывода из организма после завершения необходимой функции — незначительно. Необходимость сохранения рецепторопосредованного эндоцитозного пути при проникновении комплекса в раковую клетку — также необходимое условие их применения в диагностике и лечении. С учетом этих требований из огромного количества пептидных гормонов в настоящее время прошли «естественный» отбор только небольшое количество их [154]. Это — соматостатин и его аналоги, холецистокинин/гастрин, α -меланоцитстимулирующий гормон, бомбезин, нейротензин, вещество Р, окситоцин, нейропептид Y и ряд других.

Как отмечено выше соматостатиновые аналоги были первыми пептидами, которые применили на практике. Высоко аффинные рецепторы этого гормона присутствуют во многих тканях организма, участвуя в различных биологических эффектах. Важно то, что в ходе онкологического перерождения некоторых видов тканей, особенно нейроэндокринных органов, количество рецепторов резко возрастает по сравнению с «нормой» [155]. В качестве прототипа носителей металл-хелатной группировки был выбран 14-членный фрагмент соматостатина (схема 11, А) Однако этот пептид был нестабилен в плазме крови, как впрочем и все другие пептиды, и имел период полураспада 2—3 мин. Модификация этого фрагмента позволила получить его аналог — циклический октапептид (схема 11, Б), сохранивший высокий уровень сродства к одному из подтипов рецептора.

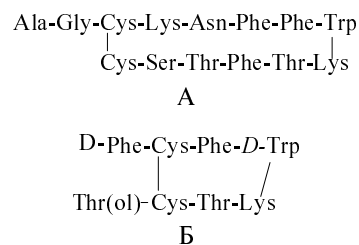


Схема 11. Структура фрагмента соматостатина и его аналога

Первым клинически значимым пептидом был октапептидный аналог, содержащий изотоп иода ^{123}I , а именно, [3- $^3\text{I-Tyr}$]-октреотид [156] (схема 12, А). Несмотря на хорошее сродство к рецептору ($IC_{50} = 2,0 \pm 0,7 \text{ нМ}$) и высокую скорость интернализации в раковые клетки этот аналог не нашел широкого применения в радиодиагностике. Причина была связана с его высокой липофильностью и быстрым захватом печенью, что приводило к низкой диагностической чувствительности. В отличие от него аналог ДТРА-октапептид (схема 12, Б), содержащий хелатную группировку, способную координировать радиоизотоп индия $^{111}\text{In}^{3+}$, и имеющий меньшее сродство к рецептору ($IC_{50} = 22 \pm 3,6 \text{ нМ}$) и меньшую скорость интернализации, был, тем не менее, более гидрофилен и не создавал проблем с его захватом печенью, как это было с предыдущим аналогом. Он вошел в медицинскую практику под названием Oxeoscan[®].

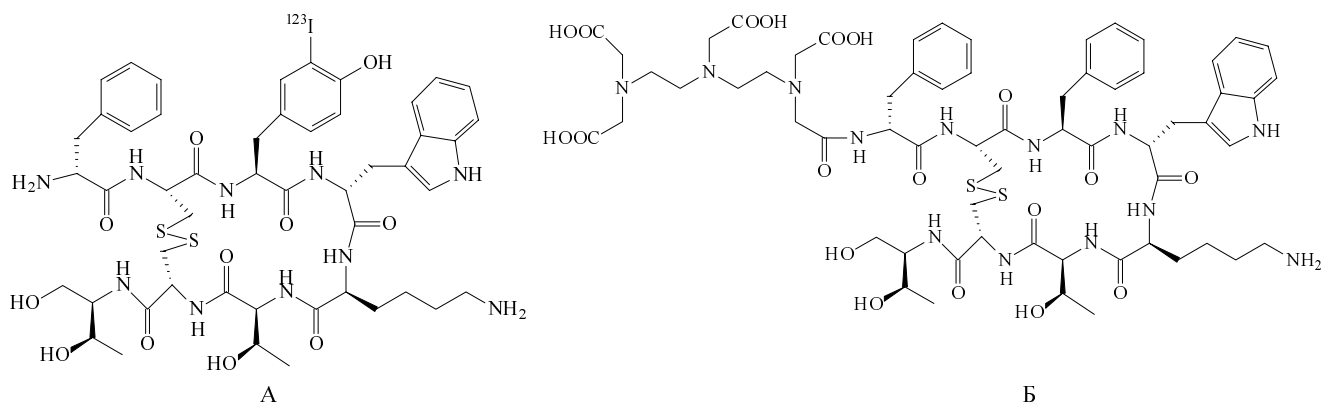


Схема 12. Структура аналогов соматостатина, используемых в медицине

Дальнейшие исследования позволили оптимизировать структуру аналога соматостатина, используя более простые аналоги соматостатина, а также заменив индий на более предпочтительный β -эмиттер, например, Y^{90} или Lu^{177} . В качестве комплексогена использовали группировку DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), которая оказалась лучшим хелатером, образуя кинетически и термодинамически более стабильный комплекс с ионами металлов. Структура одного из вариантов DOTA-[Tyr³]-октреотид (DOTA-ТОС) представлена на схеме 13.

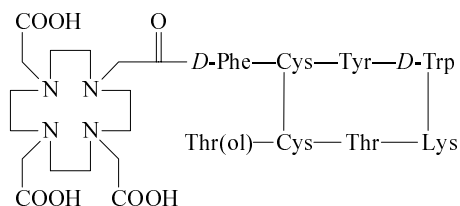


Схема 13. Структура DOTA-[Tyr³]-октреотида (DOTA-ТОС)

Широкий выбор радионуклидов [157] позволил использовать и другие изотопы металлов в γ -сцинтиграфии и позитрон-эмиссионной томографии для диагностики и радиотерапии. γ -Сцинтиграфия требует радионуклиды, испускающие γ -радиацию с энергией 100–250 кэВ (^{67}Ga , ^{99m}Tc , ^{111}In) и специальные γ -камеры. Позитрон-эмиссионная томография требует использования радионуклида, испускающего позитрон β^+ (^{55}Co , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{68}Ga и ^{86}Y), и соответствующей позитрон-эмиссионной томографической камеры.

В отличие от радионуклидов, используемых в диагностике, радионуклиды для терапии должны иметь более высокий линейный уровень выброса энергии для того, чтобы они могли разрушить раковую клетку. С учетом этих требований их можно разделить на три группы: 1) β -испускающие радионуклиды, 2) α -испускающие радионуклиды и 3) электрон-испускающие радионуклиды [158]. Радионуклиды, испускающие β -излучение, используются в терапевтических целях в клинике чаще. Связано это с тем, что в ряде случаев нет необходимости убивать каждую клетку, что можно сделать, если учитывать повреждение ткани по диаметру в зависимости от выбранного β -эмиттера. В связи с этим радионуклиды можно классифицировать как

эмиттеры: малого размера повреждения ткани (средний размер < 200 мкм, например, ^{177}Lu), среднего размера (размер 200 мкм—1 мм, например, ^{67}Cu или ^{153}Sm) и большого (средний размер > 1 мм). Как отмечалось выше, структура самого пептида очень редко позволяет использовать его для комплексования с радионуклидом. Гораздо чаще требуется введение в пептид специальных хелатных фрагментов. При выборе идеального радионуклида и хелатора с учетом времени их соединения (до связи хелатора с пептидом или после) необходимо принимать во внимание такие факторы как окислительно-восстановительные свойства металла, стабильность, заряд, липофильность/гидрофильность комплекса и конечного продукта [159].

Целенаправленная радиотерапия, обусловленная вирус-опосредованной доставкой в раковую клетку генов белков, экспонированных на поверхности клеток в виде рецепторов, специфически взаимодействующих с радионуклидосодержащими носителями

Новый подход в радиотерапии опухолей, который начал развиваться в последние годы, имеет конечной целью усиление эффекта целенаправленной радиотерапии в результате комбинации методов. На первом этапе в раковую клетку доставляются гены, кодирующие определенные белки, которые изначально не присутствуют в клетке и отдельные фрагменты которых появляются на трансфицированной клетке в виде рецепторов. Именно с этими рецепторами специфически взаимодействуют носители, нагруженные соответствующими соединениями и несущие радионуклидные комплексы. Иными словами, в раковую клетку в результате целевого транспорта доставляются определенные гены, которые начинают использоваться синтетическим аппаратом клетки для производства новых, не собственных раковой клетке белков. Вновь возникшие белки, экспонированные на мембране раковой клетки, используются на втором этапе как мишени для взаимодействия с соединениями, специфически реагирующими с ними и несущими, в свою очередь, α - или β -эмиттерные радионуклиды. Таким образом, в этом случае мы имеем дело с расширением числа группировок на раковой клетке, специфически взаимодействующих с радионуклидоносителями.

Преимуществом этого подхода является то, что на мембраны раковых клеток «принудительно» вводятся рецепторы, которых на ней нет. Как носители радио-

нуклидов на втором этапе могут выступать, например, антитела к новым иммуногенам на поверхности раковых клеток. Несмотря на некоторые проблемы, связанные с их использованием, которые были обсуждены выше, эффективность антител как носителей радионуклидов связана не только со способностью убивать раковую клетку в результате облучения [160], но определяется также цитотоксическим эффектом самих антител, апоптозом, комплементопосредованным цитолизом и антителозависимой клеточной цитотоксичностью. Этот подход оказался полезным в отношении В-клеточной лимфомы [161]. Применимость радиомеченных антител против карциноэмбрионного антигена (СЕА) была проверена на различных видах рака [162]. В опытах *in vitro* было показано, что аденовирус-опосредованный транспорт гена СЕА привел к появлению высокого уровня экспрессии СЕА в раковой клетке, что привело к их взаимодействию с радиомечеными анти-СЕА-антителами. Эти данные нашли подтверждение в опытах *in vivo* [163]. Однако радиотерапия с использованием антител была менее впечатляюща для других видов рака. Среднее значение аккумулялированных меченых антител составило 0,005% на введенную активность, что конечно явно недостаточно для подавления рака [164].

В связи с этим были сделаны попытки заменить радиомеченные антитела на сравнительно короткие пептиды, рецепторы для которых на раковые клетки были введены с использованием того же подхода вирусной доставки генов. Например, был осуществлен вирусопосредованный транспорт гена рецепторов для тиреотропин-рилизинг гормона (TRH). Рецепторы, как было показано ранее, взаимодействовали с радиомеченным TRH [165]. Недостаток этого малого трипептида — короткий период жизни пептида в плазме крови и, что более важно, значительная потеря сродства к рецептору после связывания с радионуклидом. Тем не менее, применимость подобного подхода была подтверждена, например, в случае радионуклидного производного семичленного аналога бомбезина, который специфически взаимодействовал с раковой клеткой после того, как клетка была предварительно трансфицирована геном (вирусопосредованный подход), кодирующим гастрин-рилизинг-пептидный рецептор [166]. Аналог бомбезина связывался с несколькими вариантами радионуклидов, сохраняя при этом высокое сродство к гастрин-рилизинг-пептидным рецепторам.

Антиангиогенез. Пептидные гормоны как ингибиторы неконтролируемого роста клеток

В принципе, все промежуточные этапы онкологического перерождения клеток могут быть мишенью терапевтического воздействия. В первую очередь следует выделить такие направления воздействия на раковую опухоль, как факторы роста кровеносных сосудов и молекулы адгезии клеток. Среди последних достаточно перспективными оказались, например, поверхностные клеточные маркеры, интегрин, количество которых в ходе онкологического перерождения клеток, их концентрация на поверхности клеток резко возрастает. Наиболее хорошо изученным из соединений, взаимодействующих с интегринами, является так называемый RGD (Arg-Gly-Asp) пептид [167]. Пептиды, содержащие RGD последовательность, имеют вы-

сокую аффинность к интегринам и, как было показано, предотвращают рост раковых клеток *in vivo* [168]. Циклический пентапептидный RGD аналог, содержащий на С-конце меркаптогруппу был конъюгирован с малеинимид-ПЭГ-дистеароилфосфатидил-этанололамином, что привело к пептидсодержащим липосомам, показавшим в опытах *in vitro* хорошую аффинность к рецепторам сосудистого эпителия раковой клетки [169].

Однако наиболее перспективными в плане создания соединений, ингибирующих неконтролируемый рост кровеносных сосудов, будут соединения с антиангиогенезной активностью на основе пептидных гормонов и их аналогов. Ангиогенез является критическим процессом многих биологических функций в организме, начиная с нормальных процессов, таких как эмбриогенез и заживление ран, где рост новых микрососудов является жизненно важным и контролируемым процессом, до жизненно опасных процессов, вышедших из под контроля, одним из которых является рост раковых клеток, образование твердых опухолей и появление метастазов, а также ишемическая болезнь и хронические воспаления [170]. Ангиогенез, индуцированный раковыми клетками, является сложным процессом, он включает многие факторы и различные сигналы. Среди них блокирование взаимодействий между эндотелиальным фактором роста сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и VEGF-рецептором является только одним примером возможности подавления неконтролируемого роста клеток в результате ингибирования ангиогенеза. Как только ангиогенез перестает быть регулируемым процессом, это приводит к необратимым и нерегулируемым процессам размножения клеток, например, к росту твердых опухолей и метастазам. Способность раковых клеток индуцировать образование новых кровеносных сосудов находится в фокусе многих исследований в последнее десятилетие.

Среди биологически активных пептидов, участвующих в регулировании ангиогенеза и способных быть антиангиогенными соединениями, большое значение имеют сравнительно короткие пептидные гормоны. Было, в частности, показано, что многие кинины, например брадикинин, являются важными регуляторами роста раковых клеток. Поэтому не случайно были найдены высокоактивные противораковые соединения на основе брадикинина, его димерных форм и пептидомиметиков [171], которые могут найти применение при лечении рака легких и простаты. Было также установлено, что укороченный аналог ангиотензина, ангиотензин-(1-7) действует как хороший ингибитор VEGF *in vivo* и *in vitro* через систему выделения NO [172]. Интерлейкин-2 также оказался весьма перспективным антиангиогенным соединением, действующим по механизму индукции выделения NO [173]. С использованием данных рентгеноструктурного анализа VEGF и расчетных методов были сконструированы и получены VEGF-нейтрализующие пептиды, конкурирующие за VEGF-рецепторы на эндотелиальных клетках сосудов [174].

Существует мнение, что разработка и использование соединений, ингибирующих ангиогенез *in vivo*, станет одним из самых многообещающих достижений в терапии рака в недалеком будущем [175]. В то же время следует быть готовым к тому, что «перекрытие» одного из каналов неконтролируемого роста раковых

клеток с применением гомонов или их аналогов не обязательно приведет к полному подавлению ангиогенеза. Живой организм очень сложная система, и вполне вероятно, что могут быть «включены» новые, неизвестные до сих пор пути стимулирования неконтролируемого ангиогенеза. Но это не должно останавливать и не остановит поиски новых подходов к подавлению неконтролируемого перерождения клеток, среди которых найдут себе применение и гормоны, их укороченные аналоги или полифункциональные полимерные конъюгаты гормонов, позволяющие иметь в конъюгате дополнительные биологически активные противораковые добавки.

* * *

Автор данного обзора не ставил перед собой задачу охватить всю литературу по синтезу, изучению и применению пептидных гормонов, их аналогов и производных. Задача была гораздо скромнее — постараться проследить тенденцию развития синтетической химии пептидов с момента зарождения до наших дней в отношении синтеза пептидных гормонов, их модификации и некоторых направлений возможного использования — развития, которое было отмечено успехами и неудачами. Насколько удалось проследить эти тенденции — судить не мне. Убежден, что значительная часть материала не была охвачена. В любом случае я приношу свои извинения за отбор примеров — он связан с моими собственными интересами и пристрастиями.

Словарь терминов

Агонист (антагонист) — аналог, действующий односторонне (противоположно) с природным гормоном

Гомодетциклические аналоги — циклопептиды, в которых цикл образован только за счет пептидных (амидных) связей

Гетеродетциклические аналоги — циклопептиды, в циклической структуре которых наряду с пептидными (амидными, лактамными) связями присутствуют сложнэфирные (лактонные) и/или дисульфидные связи

Миметик (здесь пептидомиметик) — соединение, отличающееся по структуре от пептидов, но имеющее пептидоподобное (гормоноподобное) действие

Список сокращений

ВП — вазопрессин

ОТ — окситоцин

ТФСП — твердофазный метод синтеза пептидов

ВОР — бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)-фосфония гексафторфосфат

ССК — холецистокинин

НВТУ — о-бензотриазол-1-ил-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат

НОВт — 1-N-гидроксибензотриазол

НОНСu — N-гидрокси-сукцинимид

НК-1 — нейрокинин-1

ТВТУ — о-бензотриазол-1-ил-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторборат

TRH — тиреотропин-рилизинг гормон

VEGF (vascular endothelial growth factor) — эндотелиальный фактор роста сосудов

ЛИТЕРАТУРА

1. *Du Vigneaud V., Ressler Ch., Swan J.M. e. a.* J. Am. Chem. Soc., 1953, v. 75, p. 4879—4880.
2. *Du Vigneaud V., Gish D.T., Katsoyannis P.G.* Ibid., 1954, v. 76, p. 4751—4752.
3. *Gish D.T., Katsoyannis P.G., Gish G.P., Stedman R.S.* Ibid., 1956, v. 78, p. 5954.
4. *Schwyzler R., Sieber P.* Nature, 1963, v. 199, p. 172—174.
5. *Bajusz S., Sieber P., Rivel W.* Acta. Chim. Acad. Sci. Hung., 1972, v. 55, p. 1243—1248.
6. *Siber P., Kamber B., Hartman A.* Helv. Chim. Acta, 1974, v. 57, p. 2617—2621.
7. *Merrifield R.B.* J. Am. Chem. Soc., 1963, v. 85, p. 2149—2154.
8. *Merrifield R.B.* Biochemistry, 1964, v. 3, p. 1385.
9. *Marshall G.R., Merrifield R.B.* Ibid., 1965, v. 4, p. 2394—2401.
10. *Manning M.J.* Am. Chem. Soc., 1968, v. 90, p. 1348—1349.
11. *Li C.H., Dixon J.S., Liu W.K.* Arch. Biochem. Biophys., 1969, v. 133, p. 70—91.
12. *Li C.H., Yamashiro D.* J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, p. 7608—7609.
13. *Li C.H., Dixon J.S.* Arch. Biochem. Biophys., 1971, v. 146, p. 233—236.
14. *Chillemi F., Pecile A.* Experientia, 1971, v. 27, p. 385—386.
15. *Giannis A., Rubsam F.* Adv. Drug Res., 1997, v. 29, p. 1—78.
16. *Marshall G.R.* Tetrahedron, 1993, v. 49, p. 3547—3621.
17. *Law H.D., du Vigneaud V.* J. Am. Chem. Soc., 1960, v. 82, p. 4579—4584.
18. *Chimiak A., Eisler K., Jost V., Rudinger J.* Coll. Czech. Chem. Commun., 1968, v. 33, p. 2918—2926.
19. *Huguenin R.L.* Helv. Chim. Acta., 1964, v. 47, p. 1934—1941.
20. *Hope D.B., Murti V.V., du Vigneaud V. e. a.* J. Biol. Chem., 1962, v. 237, p. 1563—1566.
21. *Walti M., Hope D.B.* J. Chem. Soc., Perkin I, 1974, p. 202—205.
22. *Zaoral M., Kolc J., Sorm F.* Coll. Czech. Chem. Commun., 1967, v. 32, p. 1250—1257.
23. *Rudinger J., Jost K.* Experientia, 1964, v. 20, p. 570—571.
24. *Martinez J., Bali J.-P., Rodrigez M. e. a.* J. Med. Chem., 1985, v. 28, p. 1874—1879.
25. *Roubini E., Laufer R., Gilon C. e. a.* Ibid., 1991, v. 34, p. 2430—2438.
26. *Almquist R.G., Olsen C.M., Uyeno E.T., Toll L.* Ibid., 1984, v. 27, p. 115—120.
27. *Edwards J.B., Lean L.R., Wade A.C. e. a.* Int. J. Pept. Prot. Res., 1994, v. 43, p. 374—379.
28. *Brady S.V., Cochran D.W., Nutt R.F. e. a.* Ibid., 1984, v. 23, p. 212—217.
29. *Benedetti E., Toniolo C., Hardy P. e. a.* J. Am. Chem. Soc., 1984, v. 106, p. 8146—8152.
30. *Bonara G.M., Toniolo C., DiBlasio B. e. a.* Ibid., 1984, v. 106, p. 8152—8156.
31. *Davies J.S.* J. Pept. Sci., 2003, v. 9, p. 471—501.
32. *Brockman H., Lackner H.* Chem. Ber., 1968, Bd. 101, S. 1312—1317.
33. *Meienhofer J.* J. Am. Chem. Soc., 1970, v. 92, p. 3771—3777.
34. *Drickman H., Lackner H.* Chem. Ber., 1967, Bd. 100, S. 353—359.
35. *Vlasov G.P., Lashkov V.N.* Proc. 15-th European Peptide Symposium «Peptides 1978». Gdansk, Poland, September 1978, Wroclaw University Press, p. 365—368.
36. *Власов Г.П., Лашков В.Н., Куликов С.В., Гунзбург О.Ф.* Ж. орган. химии, 1978, т. 14, с. 1961—1970.
37. *Mutulis F.K., Chipens G.I., Mutule I.E., Maurops G.H.* Int. J. Pept. Protein Res., 1985, v. 26, № 449, p. 37—43.

38. Chipens G.I., Mutulis F. K., Myshlyakova N.V. e. a. *Ibid.*, 1985, v. 26, p. 460–467.
39. Schiller P.W., Nguyen T.M.D., Limieux C., Maziak L.A. *J. Med. Chem.*, 1985, v. 28, p. 1766–1771.
40. Schiller P.W., Nguen T.M.-D., Limieux C. *Tetrahedron*, 1988, v. 44, p. 733–740.
41. Bordusa F. *Chem. Biochem.*, 2001, v. 2, p. 405–409.
42. Jackson D.Y., Burnier J.P., Wells J.A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, v. 117, p. 819–820.
43. Pelton J.T., Gulya K., Hraby V.J. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, v. 82, p. 236–239.
44. Aubry A., Birlirakis N., Sakarellos-Daifiotis M. e. a. *Biopolymers*, 1989, v. 28, p. 27–40.
45. Marshall G.R. *Ibid.*, 2001, v. 60, p. 246–277.
46. Sasaki Y., Murphy W.A., Heiman M.L. e. a. *J. Med. Chem.*, 1987, v. 30, p. 1162–1166.
47. Hirschman R. *Angew. Chem. Int. Ed., Engl.*, 1991, v. 30, p. 1278–1301.
48. Olson G.L., Cheung H.C., Chiang E. e. a. *J. Med. Chem.*, 1995, v. 38, p. 2866–2879.
49. Coy D.H., Heinz-Erian P., Jiang N.-Y. e. a. *J. Biol. Chem.*, 1988, v. 263, p. 5056–5060.
50. См. ссылку [45], с. 252.
51. Smith J.A., Pease L.G. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1980, v. 8, p. 315–399.
52. Richardson J.S. *Adv. Prot. Chem.*, 1981, v. 34, p. 167–339.
53. Stanfield R.L., Fieser T.M., Lerner R.A., Wilson I.A. *Science*, 1990, v. 248, p. 712–719.
54. Wood S.P., Tickle I.J., Treharne A.M. e. a. *Ibid.*, 1986, v. 232, p. 633–636.
55. Lippens G., Halenga K., van Belle D. e. a. *Biochemistry*, 1993, v. 32, p. 9423–9434.
56. Wang J., Hodges R.S., Sykes B.D. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, v. 117, p. 8627–8634.
57. Schmidt B., Lindman S., Tong W. e. a. *J. Med. Chem.*, 1997, v. 40, p. 903–919.
58. Sato M., Lee J.Y.H., Nakanishi H. e. a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, v. 187, p. 999–1006.
59. Mouillac B., Chini B., Balestre M.-N. e. a. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 25771–25777.
60. Lippens G., Halenga K. van Belle D. e. a. *Biochemistry*, 1993, v. 32, p. 9423–9434.
61. Evans B.E., Rittle K.E., Bock M.G. e. a. *J. Med. Chem.*, 1988, v. 31, p. 2235–2246.
62. Lipmann F., Hotchkis R., Dubos R. *J. Biol. Chem.*, 1941, v. 141, p. 163–169.
63. Gross E., Morell J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, v. 93; *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1981, v. 17, p. 275–283.
64. Erspamer V. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1992, v. 10, p. 3–30.
65. Mignogna G., Simaco M., Creil G. e. a. *EMBO J.*, 1993, v. 12, p. 4829–4832.
66. Kamatani Y., Minakata H., Keny P.T.M. e. a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, v. 160, p. 1015–1020.
67. Soyez D., van Herp F., Rossier J. e. a. *J. Biol. Chem.*, 1994, v. 269, p. 18295–18298.
68. Tancredi T., Temussi P.A., Picone D. e. a. *Biopolymers*, 1991, v. 31, p. 751–760.
69. Kamatani Y., Minakata H., Iwashiyama T. e. a. *FEBS Lett.*, 1990, v. 276, p. 95–97.
70. Pert C.B., Pert A. *Science*, 1976, v. 194, p. 330–332.
71. Dutta A.S. e. a. In: *Peptides 1978*. Eds. I. Siemion, G. Kup-riszewski. Wrocław: University Press, 1979, p. 537–540.
72. Del Milton R.C., Milton S.C.F., Kent S.B.H. *Science*, 1992, v. 256, p. 1445–1448.
73. Goldstein A., Fischli W., Lowney L.I. e. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, p. 7219–7223.
74. Chavkin C., Goldstein A. *Ibid.*, 1981, v. 78, p. 6543–6547.
75. Thomas H.A., Wei E.T. *Peptides*, 1995, v. 16, p. 547–550.
76. Wei E.T., Thomas H.A. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, v. 33, p. 91–108.
77. Wei E.T., Tomas H.A., Gjerde E.-A. e. a. *Peptides*, 1998, v. 19, p. 767–775.
78. Trzepalka E., Kowalczyk W., Lammek B. *J. Pept. Res.*, 2004, v. 63, p. 333–346.
79. Vlasov G.P., Wei E.T., Burov S.V., Korol'kov V.I. *Peptides 1998*, *Proc. of the 25 Eur. Peptide Symp. August 30–September 4, 1998*, Budapest, Hungary. Eds. S. Bajusz, F. Hudecz, 1999, p. 778–779.
80. Stern P.S., Chorev M., Goodmam M., Hagler A.T. *Biopolymers*, 1983, v. 22, p. 1885–1900.
81. Stern P.S., Chorev M., Goodmam M., Hagler A.T. *Ibid.*, 1983, v. 22, p. 1901–1917.
82. Goodman M. *Ibid.*, 1985, v. 24, p. 137–155.
83. Chorev M., Goodmam M. *Trends Biotechnol.*, 1995, v. 13, p. 438–445.
84. Fletcher M.D., Campbell M.M. *Chem. Rev.*, 1998, v. 98, p. 763–795.
85. Pallai P., Struthers S., Goodman M. e. a. *Biopolymers*, 1983, v. 22, p. 2523–2538.
86. Bonelli F., Pecci A., Verdini A.S. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1984, v. 24, p. 553.
87. Van Egenmortel M.H.V., Muller S. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1988, v. 9, p. 377–382.
88. Muller S., Briand J.P. *Res. Immunol.*, 1998, v. 149, p. 55–57.
89. Vlasov G.P., Glushenkova V.R., Kotin A.M. e. a. *Chemistry of Peptides and Proteins*, 1989, v. 4, p. 89–94.
90. Ling N., Biard A., Wehrenberg W. B. e. a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, v. 295, p. 854.
91. Gohring W., Moroder L., Borin A. e. a. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1984, v. 365, p. 83–91.
92. Martinez J., Mogous R., Lignon M.-F. e. a. *J. Med. Chem.*, 1984, v. 27, p. 1597–1608.
93. Penke B., Hajnal F., Lonovics J. e. a. *Ibid.*, 1984, v. 27, p. 845–851.
94. Kaiser E.T., Kezdy F.J. *Science*, 1984, v. 223, p. 249–255.
95. Kaiser E.T., Kezdy F.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 80, p. 1137–1143.
96. Nir S., Nieva J. *Progress in Lipid Research*, 2000, v. 39, p. 181–206.
97. Liu L.-P., Li S.-Ch., Goto N.K., Deber Ch.M. *Biopolymers*, 1996, v. 39, p. 465–470.
98. Niidome T., Urakawa M., Takaji K. e. a. *J. Peptide Res.*, 1999, v. 54, p. 361–367.
99. Deber Ch. M., Li Sh.-Ch. *Biopolymers*, 1995, v. 37, p. 295–318.
100. Cornut I., Buttner K., Dasseux J.-L., Dufourcq J. *FEBS Letters*, 1994, v. 349, p. 29–33.
101. Гурьянов И.А., Власов Г.И. и др. *Биоорганическая химия*, 2005, т. 31, с. 1–19.
102. Krstenansky J., Zechel Ch. e. a. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1998, v. 32, p. 468–475.
103. Zahn H., Gutte B., Pfeifer EF, Ammon J. *Liebigs Ann. Chem.*, 1966, v. 691, p. 225.
104. Katsoyannis P. G., Tometsko A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, v. 55, p. 1554–1561.
105. Rutenberg M.A. *Science*, 1972, v. 177, p. 623–626.
106. Carpenter F.H. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, v. 78, p. 539–544.
107. Glaser A.N., Bar-Eli A., Katchalski E. *J. Biol. Chem.*, 1962, v. 237, p. 1832–1838.

108. Власов Г.П., Глушенкова В.Р. и др. Тез. докл. 2 Всес. симп. по химии пептидов. Душанбе, 1969, с. 14.
109. Власов Г.П., Глушенкова В.Р., Болотина И.А. Ж. орган. химии, 1972, т. 42, с. 1128—1132.
110. Vlasov G.P., Guryanov I.A., Bayanova N.V. e. a. J. Pept. Sci. Suppl., 2004, v. 10, p. 559.
111. Herrmanson G.T. Bioconjugate Techniques. Academic Press, 1996.
112. Vlasov G.P. Macromol. Rev., 2003, v. 197, p. 331—343.
113. Шельх Г.И., Кольцова С.В., Власов Г.П., Самсонов Г.В. Прикл. биохимия и микробиол., 1979, т. 15, с. 82—85.
114. Abuchowski A., van Es T., Palchuk N.C., Davis F.F. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 3578—3581.
115. Ito Y., Kotoura M., Chung D.-J., Imanishi Y. Bioconjug. Chem., 1994, v. 4, p. 358—361.
116. Matsukata M., Takei Y., Aoki T. e. a. Ibid., 1997, v. 7, p. 96—101.
117. Ding Z., Chen G., Hoffman A.S. Ibid., 1997, v. 7, p. 121—125.
118. Lee H., Park T.G. Biotechnol. Prog., 1998, v. 14, p. 508—516.
119. Takei Y.G., Matsukata M.T., Aoki K. e. a. Bioconjug. Chem., 1994, v. 5, p. 577—582.
120. Vlasov G.P., Illarionova N.G., Izvarina N.L., Denisov I.G. Macromol. Chem., Suppl., 1985, v. 9, p. 239—249.
121. Власов Г.П., Никонова И.Н., Илларионова Н.Г. Прикл. биохимия и микробиол., 1981, т. 17, с. 494—499.
122. Власов Г.П., Изварина Н.Л., Илларионова Н.Г. Биохимия, 1981, т. 46, с. 942—950.
123. Власов Г.П., Никонова И.Н., Илларионова Н.Г., Денисов И.Г. Прикл. биохимия и микробиол., 1987, т. 23, с. 600—606.
124. Власов Г.П., Изварина Н.Л., Илларионова Н.Г. и др. Там же, 1988, т. 24, с. 56—61.
125. Власов Г.П., Панкова Г.А., Никонова И.Н., Антонов Н.Г. Биоорган. химия, 2003, т. 29, с. 37—47.
126. Hinds K., Koh J.J., Joss L. e. a. Bioconjug. Chem., 2000, v. 11, p. 196—201.
127. Uchio T., Baydys M., Liu F. e. a. Adv. Drug. Deliv. Rev., 1999, v. 35, p. 2898—2306.
128. Liu F., Song S.C., Mix D. e. a. Bioconjug. Chem., 1997, v. 8, p. 664—672.
129. Ito Y., Chung D.-J., Imanishi Y. Ibid., 1994, v. 5, p. 84—87.
130. Kay M., Liu D., Hoogerbrugge P.M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1997, v. 94, p. 12744—12746.
131. Wilson J.M. New Engl. J. Med., 1995, v. 334, p. 1185—1187.
132. Li S., Huang L. Gene Ther., 2000, v. 7, p. 31—34.
133. Smaglik P. The Scientist, 1999, v. 12, № 21, p. 1—3.
134. Smaglik P. Ibid., 1999, v. 13, № 22, p. 9—11.
135. Molas M., Gomez-Valades A.G., Vidal-Alabro A. e. a. Current Gene Ther., 2003, v. 3, p. 468—485.
136. Cheng S., Merlino G.T., Pastan I.H. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, p. 659—669.
137. Wu G.Y., Wu C.H. J. Biol. Chem., 1987, v. 262, p. 4429—4432.
138. Wu G.Y., Wu C.H. Ibid., 1988, v. 263, p. 14621—14624.
139. Wu G.Y., Wu C.H. Ibid., 1989, v. 264, p. 16985—16987.
140. Wu G.Y., Wilson J.M., Shalaby F. e. a. Ibid., 1991, v. 266, p. 14338—14332.
141. Wilson J.M., Grossman M., Cabrera J. e. a. Ibid., 1992, v. 267, p. 11483—11489.
142. Schneder H., Huse K., Birkenmeier G. e. a. Nucl. Acids Res., 1996, v. 24, p. 3873—3874.
143. Zenke M., Steinleine M.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, v. 87, p. 3655—3659.
144. Faerkol T., Perales J.C., Eckman E. e. a. J. Clin. Invest., 1995, v. 95, p. 493—502.
145. Collins L., Gustafsson K., Farbe J.W. Transplantation, 2000, v. 69, p. 1041—1050.
146. Matinez-Fong D., Navarro-Quiroda I. Brain Res. Brain. Res. Protoc., 2000, v. 6, p. 13—24.
147. Hockett B., Ariatti M., Hawtrey A. Biochem. Pharmacol., 1990, v. 40, p. 253—263.
148. Zhang Y., Boado R.J., Partridge W.M. J. Gene Med., 2003, v. 5, p. 157—163.
149. Rosenkranz A.A., Yachmenev S.V., Jans D.A. e. a. Exp. Cell Res, 1992, v. 199, p. 323—329.
150. Kaminski M.S., Estes J., Zasadny K.R. e. a. Blood, 2000, v. 96, p. 1259—1266.
151. Kaminski M.S., Zelenetz A.D., Press O.W. e. a. J. Clin. Oncol., 2001, v. 19, p. 3918—3928.
152. Mairs R. J., Boyd M. J. Biomed. Biotechnol., 2003, v. 2, p. 102—109.
153. Ginj M., Maecke H.R. Metal Ions in Biological Systems, 2004, v. 42 (Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents), p. 109—142.
154. Wessels B.W., Rogus R.D. Med. Phys., 1984, v. 11, p. 638—645.
155. Schar J.C., Waser B., Mengod G., Reubi J.C. Int. J. Cancer, 1997, v. 70, p. 530—537.
156. Lamberts S.W.J., Bakker W.H., Reubi J.C., Krenning E.P. New Engl. J. Med., 1990, v. 323, p. 1246—1249.
157. Anderson C.J., Welch M.J. Chem. Rev., 1999, v. 99, p. 2219—2234.
158. Maecke H.R., Good S.D. In: Technetium, Rhenium and Other Metals in Chemistry and Nuclear Medicine. Eds. M. Nicolini, U. Mazzi. SGE Editiriali, Italy, 2002, v. 6, p. 35—41.
159. Liu S., Edwards D.S. Bioconjug. Chem., 2001, v. 12, p. 7—34.
160. Illidge T., Honeychurch J., Vandersteen A., Cragg M. Cancer Biother Radiopharm., 2000, v. 15, p. 581—591.
161. Press O.W., Rasey J. Semin Oncol., 2000, v. 27, p. 62—73.
162. Buchsbaum D.J., Curriel D.T. Cancer Biother Radiopharm., 2001, v. 16, p. 275—288.
163. Raben D., Buchsbaum D.J., Khazaeli M.B. e. a. Gene Ther., 1996, v. 3, p. 567—580.
164. Vaughan, A.T., Anderson, P., Dykes e. a. Br. J. Radiol., 1987, v. 60, p. 567—572.
165. Buchsbaum D.J., Raben D., Stackhouse M.A. e. a. Gene Ther., 1996, v. 3, p. 1042—1068.
166. Rogers B.E., Rosenfeld M.E., Khazaeli M.B. e. a. J. Nucl. Med., 1997, v. 38, p. 1221—1229.
167. Ruoslahti E. Annu. Cell. Dev. Biol., 1996, v. 12, p. 697—715.
168. Brooks P.C., Clark R.A. e. a. Science, 1994, v. 264, p. 569—571.
169. Janssen A.P.C.A., Schiffelers R.M., Ten Hagen T.L.M. e. a. Int. J. Pharm., 2003, v. 254, p. 55—58.
170. Griffioen A.W., Molema G. Pharmacol. Rev., 2000, v. 52, p. 237—268.
171. Gera L., Chan D.C., York E.J. e. a. Peptides 2002. Eds. E. Benedetti, C. Pedone. Proc. 22-th EPS Symposium, Editioni Ziino, 2002, p. 498—499.
172. Machado R.D.P., Santos R.A.S., Andrade S.P. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2001, v. 280, p. R994—R1000.
173. Sakkoula E., Pipili-Synetos E., Maragoudakis M.E. Brit. J. Pharmacol., 1998, v. 122, p. 793—795.
174. Taraseviciene-Stewart L., Stewart J.M., Gera L. e. a. См. [171], p. 620—621.
175. Griffioen A.W., Van der Schaft D.W.J., Barendsz-Janson A.F. e. a. Biochem. J., 2001, v. 354, p. 233—242.