

ВЕСТНИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

научный и общественно-политический журнал

том 86 № 6 2016 Июнь

Основан в 1931 г.
Выходит 12 раз в год
ISSN: 0869-5873

*Журнал издаётся под руководством
Президиума РАН*

Главный редактор
В.Е. Фортов

Редакционная коллегия

Ж.И. Алфёров, А.Ф. Андреев, В.Н. Большаков,
В.И. Васильев, Г.С. Голицын, А.И. Григорьев,
И.И. Дедов, А.П. Деревянко, Ю.М. Каган, А.И. Коновалов,
В.В. Костюк (заместитель главного редактора),
Н.П. Лавёров, Г.А. Месяц, Ю.В. Наточин,
А.Д. Некипелов, О.М. Нефёдов, В.И. Осипов, Р.В. Петров,
В.В. Пирожков (ответственный секретарь), Г.А. Романенко,
Д.В. Рундквист, А.С. Спирин, В.С. Стёпин,
Л.Д. Фаддеев, Т.Я. Хабриева, Е.П. Челышев, А.О. Чубарьян,
В.Л. Янин

Заместитель главного редактора
Г.А. Заикина

Заведующая редакцией
В.В. Володарская

Адрес редакции: 119049 Москва, Крымский вал, Марононский пер., 26
Тел.: 8(499) 238-21-44, 8(499) 238-21-23; тел.: 8(499) 238-25-10
E-mail: vestnik@naukaran.ru

Подписка на “Вестник РАН” по Москве
через Интернет WWW.GAZETY.ru

Москва
Издательство “Наука”

СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, номер 6, 2016

Научная сессия Общего собрания Российской академии наук

“Научные основы эффективности и безопасности лекарственных средств”

Вступительное слово президента РАН академика В.Е. Фортова	475
Выступление министра здравоохранения РФ члена-корреспондента РАН В.И. Скворцовой	477
Инновационные лекарственные средства XXI века. Доклад академика РАН А.Г. Чучалина	480
Методология поиска и создания оригинальных лекарств. Доклад академика РАН С.Б. Середенина	484
Инновационные лекарства: от фундаментальных исследований к производству. Доклад академика РАН Н.Ф. Мясоедова	488
Новый класс доноров оксида азота. Доклад академика РАН С.М. Алдошина, доктора химических наук Н.А. Саниной, академика РАН М.И. Давыдова, академика РАН Е.И. Чазова	495
Векторные наносистемы доставки лекарственных препаратов в клетки-мишени. Доклад академика РАН В.П. Чехонина, академика РАН А.А. Потапова, академика РАН А.Н. Коновалова	501
Рекомбинантные антитела и рекомбинантные белки – лекарства пролонгированного действия. Доклад члена-корреспондента РАН А.Г. Габиева	506
Регуляция активности генов и новые лекарственные средства. Доклад члена-корреспондента РАН В.И. Киселёва, академика РАН М.А. Пальцева	512
Безопасные лекарства: миф или реальность. Доклад академика РАН А.И. Арчакова, доктора биологических наук О.М. Ипатовой, члена-корреспондента РАН А.В. Лисицы, доктора биологических наук С.А. Мошковского	519
Компьютерное моделирование в молекулярной медицине и конструирование лекарств. Доклад члена-корреспондента РАН С.Д. Варфоломеева, кандидата химических наук С.В. Луцкиной, доктора химических наук А.В. Немухина	524
Фармакологическая стратегия регенеративной медицины. Доклад академика РАН А.М. Дыгая	533
Конструирование противогриппозных вакцин в соответствии с генетическим профилем населения. Доклад академика РАН Г.Г. Онищенко, академика РАН <u>О.И. Киселёва</u>	537
Научные основы создания противовирусных и антибактериальных препаратов. Доклад академика РАН О.Н. Чупахина, академика РАН В.Н. Чарушина, члена-корреспондента РАН В.Л. Русинова	546
Растительное биоразнообразие и здоровье человека. Доклад академика РАН В.А. Быкова	553
Исследование природных соединений – путь к новым лекарствам. Доклад академика РАН В.А. Стоника	557
Выступления участников Научной сессии Общего собрания РАН: члена-корреспондента РАН И.В. Воловича, члена-корреспондента РАН В.В. Васильева, члена-корреспондента РАН Н.Э. Нифантьева, члена-корреспондента РАН С.М. Деева, члена-корреспондента РАН Т.А. Гуськовой, академика РАН А.Я. Самуйленко, академика РАН Ю.В. Цветкова, академика РАН Н.А. Колчанова, академика РАН М.И. Кузьмина	566
Заключительное слово президента РАН академика В.Е. Фортова	572
Постановление Научной сессии Общего собрания РАН “Научные основы эффективности и безопасности лекарственных средств”	573
Официальный отдел	
Президиум РАН решил	575

CONTENTS

Vol. 86, No. 6, 2016

Simultaneous English language translation of the journal is available from Pleiades Publishing, Ltd.
Distributed worldwide by Springer. *Herald of the Russian Academy of Sciences* ISSN 1019-3316

Scientific Session of the RAS General Meeting “Scientific Basis of Efficiency and Safety of Pharmaceuticals”

Keynote Speech by RAS President Academician V.E. Fortov	475
Speech by Minister of Public Health of the Russian Federation, Correspondent Member of RAS V.I. Skvortsova	477
Innovative Pharmaceuticals in the Twenty-First Century. <i>Report by Academician A.G. Chuchalin</i>	480
Methodology for Searching and Creation of Original Drugs. <i>Report by Academician S.B. Seredenin</i>	484
Innovative Medicines: from Fundamental Research to Production. <i>Report by Academician N.F. Myasoedov</i>	488
A New Class of Nitrogen Monoxide Donors. <i>Report by Academician S.M. Aldoshin, Doctor of Chemical Sciences N.A. Sanina, Academician M.I. Davydov, Academician V.I. Chazov</i>	495
Vector Nanosystems for Drug Delivery to Target Cells. <i>Report by Academician V.P. Chekhonin, Academician A.A. Potapov, Academician A.N. Kononov</i>	501
Recombinant Antibodies and Recombinant Proteins – Drugs of Prolonged Action. <i>Report by Corresponding Member of RAS A.G. Gabibov</i>	506
Regulation of Gene Activity and New Drugs. <i>Report by Corresponding Member of RAS V.I. Kiselev and Academician M.A. Paltsev</i>	512
Safe Pharmaceuticals: Myth or Reality. <i>Report by Academician A.I. Archakov, Doctor of Biological Sciences O. M. Ipatava, Corresponding Member of RAS A.V. Lisitsa, Doctor of Biological Sciences S.A. Moszkowskiy</i>	519
Computer Modelling in Molecular Medicine and Construction of Drugs. <i>Report by Corresponding Member of RAS S.D. Varfolomeyev, Candidate of Chemical Sciences S.V. Lushkina, Doctor of Chemical Sciences A.V. Nemukhin</i>	524
Pharmacological Strategy for Regenerative medicine. <i>Report by Academician A.M. Dygai</i>	533
Designing of Influenza Vaccines according to the Genetic Profile of the Population. <i>Report by Academician G.G. Onishchenko, Academician O.I. Kiselev</i>	537
Scientific Basis for Developing of Antiviral and Antibacterial Drugs. <i>Report by Academician O.N. Chupakhin, Academician V.N. Charushin, Corresponding Member of RAS V.L. Rusinov</i>	546
Mobilization of Plant Diversity to Create Effective and Safe Medicinal Herbal Remedies. <i>Report by Academician V.A. Bykov</i>	553
Investigation of Natural Compounds as a Route to New Drugs. <i>Report by Academician V.A. Stonic</i>	557
Speeches by the Participants of the Scientific Session of the RAS General Meeting: Corresponding Member of RAS I.V. Volovich, Corresponding Member of RAS V.V. Vasiliev, Corresponding Member of RAS N.E. Nifantiev, Corresponding Member of RAS S.M. Deyev, Corresponding Member of RAS T.A. Gus'kova, Academician A.Ya. Samuilenko, Academician Yu. V. Tsvetkov, Academician N.A. Kolchanov, Academician M.I. Kuzmin	566
Closing Remarks by the RAS President Academician V.E. Fortov	572
Resolution of the Scientific Session of the RAS General Meeting “Scientific Basis of Efficiency and Safety of Pharmaceuticals”	573

Official Section

Decisions of the RAS Presidium	575
--------------------------------	-----

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО ПРЕЗИДЕНТА РАН
АКАДЕМИКА В.Е. ФОРТОВА

e-mail: fortov@ras.ru

DOI: 10.7868/S0869587316060025

Открывая собрание, я хочу огласить приветствие, с которым к участникам Научной сессии Общего собрания РАН обратился председатель Правительства Российской Федерации Д.А. Медведев.

“Уважаемые друзья! Вам предстоит обсудить актуальные вопросы, связанные с обеспечением людей эффективными и безопасными лекарствами. Это очень чувствительная тема, которая касается каждого человека, в первую очередь пожилых граждан, инвалидов и детей.

Важно, что Российская академия наук наряду с ведущими медицинскими учреждениями серьёзно занимается решением этой актуальной проблемы.

Сегодня перед нашей страной остро стоит задача импортозамещения во всех отраслях экономики и особенно в сфере производства медикаментов. Россия должна сама обеспечить потребности своих граждан в современных и качественных препаратах. Для этого у нас есть всё: фармацевтические лаборатории и предприятия, фундаментальная исследовательская база, многолетние научные разработки и, самое главное, талантливые специалисты, обладающие глубокими знаниями, опытом и, что крайне важно, желанием сохранить здоровье людей.

Рассчитываю, что участники Научной сессии внесут весомый вклад в создание отечественных инновационных лекарственных средств.

Желаю вам успешной работы и всего самого доброго!

Дмитрий Медведев”

Нынешняя Научная сессия посвящена очень важной теме, актуальность которой подчёркивать в этом зале, наверное, не имеет смысла, потому что она касается каждого из нас, наших родных, близких, друзей и коллег.

Обеспечение населения лекарственными средствами относится к числу важнейших приоритетов нашего государства. Эта проблема имеет большое социальное значение, поскольку речь идёт о сбережении нации, о том, чтобы люди в России жили долго, чтобы им было обеспечено

высокое качество жизни, чтобы они могли трудиться и растить детей в полную силу.

На решение посвятить Научную сессию именно этой теме повлиял тот факт, что речь идёт о междисциплинарной области исследований. В разработке и производстве современных лекарственных средств, как известно, участвуют представители фактически всех научных дисциплин — и физики, и химики, и биологи, и генетики, и математики. Только объединив усилия разных специалистов, можно создать отвечающие современному уровню конкурентоспособные лекарства.

Работы по созданию лекарственных препаратов всегда привлекают пристальное внимание, они напрямую связаны с вопросами импортозамещения, с вопросами технологической и производственной безопасности страны. Переход на инновационные рельсы развития на основе высоких технологий предполагает в том числе и разработку совершенных, безопасных лекарственных препаратов.

К сожалению, Россия не является лидером в производстве лекарственных средств, тем не менее фундаментальные исследования в этой области у нас проводятся на хорошем уровне. Уверен, что доклады, которые будут представлены сегодня выдающимися отечественными учёными, продемонстрируют это в полной мере. Программа сессии составлена так, чтобы охватить практически все представляющие интерес аспекты проблемы лекарственного обеспечения. Я надеюсь, что учёные тех специальностей, которые пока не вовлечены в эту работу, найдут для себя возможность поучаствовать в ней, внести свой вклад в благородное и крайне ответственное дело, в решение тех задач, которые ставит перед нами руководство страны.

Надо сказать, что исследования по фармакологии начались одновременно с появлением медицины. Конечно, прежде всего в памяти всплывает имя Гиппократ, который одним из первых систематически изучал свойства растений и препаратов из них, составил подробные их описания. В России первая аптека была открыта ещё при Иване Грозном, а с появлением Академии наук в

ней сразу были организованы классы или отделения, связанные с медициной.

Отечественные врачи и учёные внесли громадный вклад в мировую медицинскую науку, в стране работали и работают мощные и продуктивные научные школы, тесно связанные с лечебной практикой. Наша задача — обеспечить их деятельность на современном уровне, на уровне передовых знаний, с учётом нынешних реалий. Крайне важно добиться того, чтобы специалисты разных научных направлений, которые собраны в Академии наук, могли эффективно взаимодействовать, разрабатывая лекарства, в которых остро нуждаются наши сограждане. Следует отметить, что объединение трёх наших академий в одну, работа в новом формате даёт нам дополнительные возможности ускорить этот процесс и добиваться всё новых и новых результатов.

Неслучайно в названии нынешней Научной сессии звучит тема безопасности. Появление новых методов лечения, в первую очередь генетических, влечёт за собой определённые риски. Как говорил Гиппократ, *лучшее лекарство — это*

не прибегать к лекарствам, имея в виду, что применение лекарств всегда связано с тем или иным риском. Во времена Гиппократа люди имели ещё очень отдалённое представление о работе самого совершенного объекта природы — человеческого организма, и Гиппократ призывал к тому, чтобы риск был осознанным и преследовал исключительно благородные цели.

Эта проблема актуальна и в наше время. Появляется всё больше новых соединений и препаратов, и применение их в практической медицине должно быть абсолютно безопасным. Об этом мы тоже будем говорить в рамках Научной сессии. Я убеждён, что таким образом будет дан новый импульс идеям, разработкам и организационным шагам, которые нам с вами предстоит сделать. Я убеждён также, что, завершая работу сессии, мы примем решение, которое даст возможность Правительству страны и Министерству здравоохранения сформировать целостную программу, которая интегрировала бы все аспекты проблемы эффективного и безопасного применения лекарственных средств.

**ВЫСТУПЛЕНИЕ МИНИСТРА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ
ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН В.И. СКВОРЦОВОЙ**

DOI: 10.7868/S0869587316060049

Развитие биомедицины на современном историческом этапе отражает и определяет социально-экономическое развитие любой страны, возможности обеспечения национальной независимости и национальной безопасности.

Реализация основных задач, которые ставит перед собой государство в области улучшения демографической ситуации, укрепления человеческого потенциала, повышения продолжительности и качества жизни, базируется на достижениях биомедицины. Лишь с помощью внедрения современных биомедицинских технологий возможно осуществить переход от стандартизованного лечения отдельных заболеваний к принципам персонифицированной медицины – к медицинскому сопровождению жизни каждого человека с применением персонифицированных методов раннего прогнозирования и профилактики, диагностики с выявлением патологических состояний на самых ранних стадиях, а при необходимости – персонифицированных фармакотерапевтических и высокотехнологичных малоинвазивных методов лечения.

Роль Российской академии наук в развитии биомедицины всегда была лидирующей, а с учётом особенностей исторического периода становится ещё более значимой. Неслучайно именно сегодня проходит сессия, посвящённая проблемам современной медицинской науки, лекарственного обеспечения населения.

Хотелось бы отметить, что только к началу XXI века фундаментальные биомедицинские науки достигли такого уровня развития, который определил возможность их выхода на передовые рубежи всей современной науки. Это касается не только нашей страны, но и всего мира. В настоящее время именно вокруг биомедицины концентрируются точные, инженерные, естественные и другие дисциплины, целевым ориентиром для которых становятся науки о жизни и человеке. Фактически биомедицина сегодня объединяет в себе области большого числа смежных наук.

Отдельно следует сказать о развитии информационных технологий, позволивших внедрить новые направления системной и количественной биологии, благодаря которым решаются задачи построения математических моделей биологических процессов, их симуляции на внутриклеточном, межклеточном и эпидемиологическом уровне. Созданы основы для прогнозирования

реакции организма на различные стимулы, в том числе стимулы лекарственные. Решаемые в данном случае задачи включают виртуальное моделирование процессов, моделирование экспериментов *in silico*, молекулярный докинг, биомолекулярный скрининг новых лекарственных средств, компьютерное моделирование пространственной структуры молекул и их взаимодействий, анализ сигнальных, регуляторных, метаболических сетей, межклеточных взаимодействий, а также сложный анализ ассоциаций геномных, транскриптомных и протеомных данных.

Министерством здравоохранения РФ по поручению Президента РФ В.В. Путина была разработана Стратегия развития медицинской науки до 2025 г., утверждённая распоряжением Правительства РФ в декабре 2012 г. Главной задачей стратегии развития медицинской науки является создание системы инновационных потоков, то есть быстрого доведения результатов научных исследований до медицинского продукта – конкретного лекарственного средства, прибора или тест-системы. Необходимо укоротить всю эту инновационную цепочку – от идеи и молекулы до создания конечного продукта – минимум в 2 раза – с 10–12 лет, как это происходит у нас сейчас, до 5–6 лет, как это происходит в странах с наиболее развитыми системами организации биомедицинской науки. Для этого прежде всего необходимо создать единую систему приоритетов и научного планирования. Только такой подход позволит устранить существующее многократное дублирование научных тематик, в том числе малозначимых, концентрировать имеющиеся финансовые и другие ресурсы в самых критических перспективных зонах, не разрывать инновационную цепочку и координировать все её этапы от научных исследований до внедрения.

Для того чтобы преодолеть имеющиеся сегодня административные межведомственные барьеры, Минздравом совместно с Российской академией наук был создан межведомственный научный совет, в который вошли представители всех заинтересованных ведомств и структур, участвующих в организации биомедицинской науки: Министерство образования и науки, Федеральное агентство научных организаций, Министерство промышленности и торговли, комитеты Государственной думы и Совета Федерации, а также научные фонды, институты развития и др.

Для управления реализацией Стратегии развития медицинской науки было выделено 14 научных платформ, или направлений (утверждены Приказом Минздрава России). Это позволило за первые полтора года провести анализ имеющихся в стране компетенций по каждому направлению, сравнил их с имеющимися компетенциями в мире и таким образом определив зоны, которые требуют ускоренного развития для предотвращения критического отставания от лидирующих медицинских школ мира.

Одной из ведущих научно-технологических платформ биомедицины является фармакология. К приоритетам её развития межведомственной группой экспертов отнесены:

- создание экспериментальных моделей, имитирующих патологические состояния человека (трансляционные модели);
- анализ изменений рецепторных структур и систем формирования клеточного ответа применительно к конкретной патологии, выявление мишеней фармакологической регуляции;
- определение молекулярных мишеней опухолевых клеток с целью создания эффективных противоопухолевых препаратов направленного действия;
- определение молекулярных мишеней микроорганизмов для создания мишень-направленных антибактериальных средств;
- разработка лекарственных форм новых фармакологически активных соединений и биотехнологических препаратов;
- разработка новых лекарственных форм уже существующих препаратов, в том числе с применением новых технологий, включая нанотехнологии, с целью оптимизации их практического использования;
- создание комбинированных лекарственных форм;
- разработка промышленных штаммов-супер-продуцентов инновационных антибиотиков;
- создание новых способов адресной доставки лекарственных препаратов.

Все эти направления зафиксированы как приоритетные направления развития отечественной фармакологии.

Для поиска новых фармакологических мишеней необходимы моделирование патологии в экспериментах *in vivo* и *in vitro* и синтез мишень-направленных фармакологически активных соединений. Поэтому планом реализации стратегии медицинской науки предусмотрено создание сети сертифицированных вивариев, банков биологического материала и чистых клеточных линий в соответствии с международными требованиями GMP и другими правилами надлежащих практик.

Следует отметить, что уже в 2016 г. должны быть созданы новые центры трансляционной медицины, которые включают в себя все необходимые компоненты для обеспечения эффективной

работы. Часть из создаваемых центров размещается на территории ведущих российских медицинских вузов, часть — на базе ведущих научных исследовательских центров в области биомедицины. Основаны они будут на кластерном принципе организации для консолидации всех научных, образовательных и других возможностей.

Среди приоритетов активно развивающихся областей фармакологии необходимо выделить:

- нейрофармакологию, базирующуюся на изучении механизмов действия различных нейротрансмиттеров, создании новых препаратов и методов их доставки, в частности, методов доставки через гематоэнцефалический барьер;
- нанобиотехнологии — применение наночастиц для направленной доставки лекарственных препаратов в поражённые клетки, а также мини-антител, предназначенных для использования в терапевтических и профилактических (вакцины) целях;
- биофармацевтические технологии, благодаря которым разработаны биотерапевтические препараты, обладающие наиболее высокой на сегодня избирательностью (таргетностью) действия;
- моделирование биологических процессов, включая компьютерный дизайн лекарств;
- иммунобиологические технологии, развивающиеся на стыке иммунологии и молекулярной биологии, а также генной инженерии.

На этом последнем направлении хотелось бы остановиться специально, поскольку особый вектор развития биомедицины в Российской Федерации задан на развитие биологической безопасности страны. Данное направление основывается на разработке вакцин против инфекционных и неинфекционных заболеваний, а также создании высокочувствительных сенсоров и методов диагностики.

На ближайшие два года сформирован план мероприятий по разработке и производству современных иммунобиологических лекарственных препаратов. Часть из них выйдет в производство уже в 2016 г.

Важнейшая задача — обеспечить в течение 3–5 лет производство отечественных сенсорных приборов и биодетекторов, работающих в автономном режиме без участия человека.

Особой проблемой, имеющей приоритетное значение для нашей страны, является область инфекционной безопасности, связанная с преодолением антибиотикорезистентности. В нашей стране, как и в других странах мира, принимаются меры, направленные на поиск новых кандидатов противобактериальных соединений, в частности, природных соединений и молекул, используемых иммунной системой для противомикробной защиты. Это направление должно быть существенно усилено, поддержано технологически и финансово.

Важно отметить, что планом реализации Стратегии развития медицинской науки предусмотрено создание Национального банка сывороток, в том числе с целью оценки популяционного иммунитета и антибиотикорезистентности населения Российской Федерации с учётом этнической принадлежности людей и мест их проживания.

Накоплен потенциал для внедрения в клиническую практику биомедицинских клеточных продуктов — как чистых клеточных линий, так и комбинированных клеточных продуктов, в том числе выращенных из клеток аутологичных тканей и органов — кожи, костной и хрящевой ткани, уретры, роговицы. Это направление является новым для нашего здравоохранения, однако следует отметить, что в настоящее время Государственной думой рассмотрен и принят в первом чтении проект федерального закона “О биомедицинских клеточных продуктах”. Мы очень надеемся на скорое его принятие, поскольку это позволит открыть шлюз для разработки и применения большого количества клеточных продуктов, которые должны повысить качество и возможности оказания медицинской помощи населению. В стране есть серьёзные наработки для обеспечения нашего устойчивого лидерства в этом направлении.

В соответствии со Стратегией национальной безопасности Российской Федерации одним из главных направлений в среднесрочной перспективе является обеспечение населения высококачественными, доступными и безопасными лекарственными препаратами. Сегодня, в период санкций, направленных на ограничение возможностей нашей страны, в том числе с точки зрения нашей фармакологической независимости, особенно важно развивать отечественную фармакологию и фармацевтическое производство и обеспечить население необходимыми препаратами.

Развитие российской иммунобиологии позволяет уже сейчас формировать наш экспортный потенциал в части вакцин против сезонного гриппа, тропических и особо опасных инфекций, востребованных во многих регионах мира. В 2015 г. начато строительство совместного производства вакцин в Никарагуа. Вакцины сертифицированы за рубежом, и есть возможность удовлетворять потребность в них центрально- и латиноамериканского региона. Это десятки миллионов доз.

С целью обеспечения безопасности в области фармакологии за последние годы сделано очень много. В 2015 г. впервые после долгого перерыва была разработана и утверждена Национальная фармакопея Российской Федерации (13-е издание). В её создании в течение полутора лет принимали участие ведущие российские эксперты в области фармакологии. По своему уровню и объёму данное издание может быть сопоставлено лишь с последним советским изданием, но исполнено оно на современном технологическом уровне. Национальная фармакопея является платформой для обеспечения качества лекарственных средств,

а следовательно, и медицинской помощи, она высоко оценена за рубежом.

Наряду с этим существенно усовершенствованы и принципы государственной регистрации лекарственных препаратов и системы контроля и надзора за их качеством и качеством лекарственных субстанций, учёта и анализа всех нежелательных эффектов и побочных действий применяемых лекарственных препаратов. В Российской Федерации создано 12 крупных стационарных лабораторных комплексов проверки качества и безопасности лекарственных препаратов, минимум по одному в каждом федеральном округе. Внедрены мобильные лабораторные комплексы, оснащённые новыми методами неразрушающего анализа качества лекарственных средств на основе спектроскопии. Это позволило существенно расширить охват проверками аптечных организаций, складов, производственных площадок. В результате количество некачественной лекарственной продукции на рынке Российской Федерации сократилось до 0.5–0.6%, а фальсификата — до 0.01%, что говорит о существенном повышении качества и безопасности лекарственных препаратов по сравнению с тем, что было ещё несколько лет назад.

С 2016 г. мы начинаем внедрять новую систему маркировки лекарственных препаратов, чтобы обеспечить возможность непрерывного отслеживания всей цепочки их обращения — от производственной площадки до поступления в аптечную сеть и до рук потребителя. Каждый человек при покупке лекарств сможет с помощью мобильных устройств, например, смартфона, подтвердить их подлинность, в том числе номер серии и другие параметры.

Таким образом, государство вместе с Российской академией наук формирует среду, в которой не только не страшно, но и привлекательно заниматься фармакологическими исследованиями и фармацевтическим бизнесом, когда возможность манипулировать лекарственными средствами исключена.

В 2015 г. выдано 612 разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов, из них 43.3% (265) — на российские клинические исследования; 60% всех зарегистрированных в 2015 г. препаратов — российские. Увеличивается число зарегистрированных отечественных препаратов, которые производятся по полному циклу или с процесса обработки лекарственной субстанции.

Дорогие коллеги, благодарю вас за возможность принять участие в работе этой важной Научной сессии РАН. Хотелось бы ещё раз вас поприветствовать и поблагодарить за огромный труд. Министерство здравоохранения Российской Федерации не просто открыто для сотрудничества — мы не представляем нашей работы без взаимодействия с Российской академией наук. От того, как мы с вами сработаем, зависит благополучие страны.

ИННОВАЦИОННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА XXI ВЕКА

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН А.Г. ЧУЧАЛИНА

Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

e-mail: chuchalin@inbox.ru

Поступил в редакцию 14.01.2016 г.

В области разработки лекарственных препаратов происходит настоящая революция. Лекарства нового поколения способны изменять течение онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета первого и второго типа. Используются так называемые “малые молекулы”, воздействующие на биологические процессы, моноклональные антитела, являющиеся ценным инструментом борьбы с клетками, вызывающими патологические процессы. Таргетные (целевые) препараты способны выявлять поражённые клетки и оказывать разрушающее воздействие исключительно в пределах злокачественного новообразования, не затрагивая при этом здоровых органов и тканей. Индивидуально подобранная медикаментозная терапия способствует быстрому улучшению состояния больного и значительно снижает риск летального исхода.

Ключевые слова: моноклональные антитела, биологические мишени, хронические неинфекционные заболевания, бета-блокаторы, гемостаз, таргетные лекарственные средства.

DOI: 10.7868/S0869587316060050

Ожидаемая продолжительность жизни человека в ближайшие 20–30 лет превысит 100-летний рубеж, и этот научный прогноз основан на достижениях, которые будут оказывать существенное влияние на качество жизни. Такого рода научные исследования связаны с разными областями знания — информационными технологиями, альтернативными методами энергетики, новыми системами транспортных коммуникаций, технологиями охраны окружающей среды и др. Особо следует выделить роль разработки и внедрения современных лекарственных средств. В настоящее время наблюдается беспрецедентная научная активность в этой сфере. В 2015 г. число клинических исследований первой, второй и третьей фаз превысило 190 тыс. Практически все научные центры мира в той или иной степени являются участниками этого процесса. Объём клинических исследований поражает воображение, продолжая расти с каждым годом.

Для проведения клинического исследования нужна теория разработки новой молекулы, которая, возможно, станет новым лекарственным средством. В XXI в., как никогда, возросла роль фундаментальных исследований по поиску биологических мишеней и разработке молекул целевого назначения, способных эффективно и безопасно вмешиваться в патобиологический про-

цесс. Стремительное развитие в области создания новых лекарственных средств основано на достижениях, связанных в первую очередь с исследованием генома человека и развитием современных знаний в области протеома (полный набор белков организма), липидома и микробиома (сообщество микроорганизмов). Современная медицина при этом придерживается принципа четырёх “П”: профилактика, прогноз, перцепция и персонализация.

Таким образом, научный прогноз увеличения средней ожидаемой продолжительности жизни человека основан на многих направлениях современной науки, но ведущая роль отводится новым лекарственным средствам, с помощью которых можно было бы эффективно и безопасно осуществить первичную, вторичную и третичную профилактику социально значимых заболеваний. Приоритетным направлением является разработка лекарств против хронических неинфекционных заболеваний (ХНЗ). Согласно стратегии Всемирной организации здравоохранения, на долю ХНЗ приходится свыше 50% всех смертельных исходов. Научный прогноз свидетельствует о том, что в ближайшие 20 лет доля ХНЗ в структуре смертности вырастет до 65–70%, то есть формируется своеобразная эпидемия. В группу ХНЗ входят сердечно-сосудистые заболевания (включая сосудистые заболевания головного мозга), рак, сахарный диабет второго типа и хроническая обструктивная болезнь лёгких. Если экстраполи-

ЧУЧАЛИН Александр Григорьевич — академик РАН, директор НИИ пульмонологии ФМБА России.

ровать стратегию ВОЗ на Российскую Федерацию, то сегодняшние демографические показатели нашей страны свидетельствуют о чрезвычайной актуальности концепции лечения ХНЗ.

У истоков формирования концепции эпидемиологии неинфекционных заболеваний стоял академик Н.Н. Блохин. Он первым в мире инициировал сессию АМН СССР по проблеме эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, которая прошла под его председательством. Материалы сессии докладывались в ВОЗ. Именно они в определённой степени позволили современному руководству ВОЗ сформировать стратегию борьбы с ХНЗ. С именем Н.Н. Блохина связаны также новые подходы к разработке противопухолевых лекарственных средств.

В 2014–2015 гг. в России умерло более 1.9 млн. человек, среди которых от сердечно-сосудистых заболеваний и инсульта – свыше 1 млн. А если учесть ещё более 300 тыс. смертей, связанных с раковыми заболеваниями, то становится понятно, насколько остро стоит проблема разработки современных лекарственных средств для лечения больных с хроническими неинфекционными заболеваниями.

В настоящее время проводится свыше 10 тыс. клинических исследований сердечно-сосудистых заболеваний, их анализ позволяет сформировать те научные направления, которые в ближайшие три-пять лет станут реальной врачебной практикой.

Одно из самых перспективных направлений относится к области липидома. Обратимся к приоритетным исследованиям, которые были проведены в СССР. Речь идёт о липидно-инфильтрационной теории атеросклероза, у истоков которой стояли академик Н.Н. Аничков и его студент С.С. Халатов. Они установили, что природа атеросклероза связана с процессом отложения в стенках сосудов избыточного количества холестерина, входящего в комплекс липопротеидов низкой плотности.

Многие учёные дали высокую оценку работам Аничкова. Так, У. Док сравнил это открытие с работами У. Гарвея (кровообращение) и А. Лавуазье (транспорт кислорода и элиминация углекислоты). Н.Н. Аничков и его ученики предвидели необходимость создания специализированных клиник по лечению дислипидемии. Эта идея была блестяще реализована В.В. Кухарчуком и Г.А. Коноваловым. Они первыми осуществили специфическую иммуносорбцию при семейной гиперхолестеринемии. Сейчас этот метод получил распространение во многих клиниках мира. Новейшим достижением в области липидологии является внедрение моноклональных антител против рецептора липопротеидов низкой плотности. Протеинконвертаза кексин-9 регулирует метаболизм холестерина в комплексе липопротеинов

низкой плотности. Экспрессия рецептора приходится на поверхность гепатоцитов. Процесс ингибирования рецептора достигается за счёт связывания его моноклональными антителами. Клинические исследования второй и третьей фазы демонстрируют высокую эффективность при лечении семейной гиперхолестеринемии, а также больных с резистентностью липидного обмена на приём статинов. Предполагается, что внедрение моноклональных антител, мишенью которых являются рецепторы липопротеидов низкой плотности, будет значительно расширено. Данная группа биологических лекарственных средств в будущем станет конкурентом терапии статинами. Высказывается предположение, что моноклональные антитела найдут применение в лечении ожирения, а также определённых форм миеломной болезни (опухолевое перерождение плазматических клеток).

Таким образом, на протяжении прошлого столетия инфилтративно-липидная теория атеросклероза была объектом многих исследований. В XXI в. сформировалось принципиально новое направление – липидомика, которое позволило генотипировать липидные нарушения, разработать базисную терапию и внедрить в клиническую практику выделение отдельных фенотипов сердечно-сосудистых заболеваний. Можно прогнозировать существенное изменение практики современных кардиологических отделений. Н.Н. Аничков и его ученики предвидели появление клиник, в которых должна проводиться корригирующая терапия дислипидемических расстройств.

Базисная терапия при лечении сердечно-сосудистых заболеваний включает бета-блокаторы, которые назначаются пациенту в качестве монотерапии или же в сочетании с ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента, тиазидовыми диуретиками. Эта группа лекарственных средств применяется также при хронической ишемии сосудов головного мозга, в офтальмологической практике, при портальной гипертензии. В настоящее время проводится 1153 клинических исследования по оценке эффективности бета-блокаторов как короткого, так и пролонгированного действия. Отечественная школа фармакологов не уделяла достаточного внимания поиску и разработке современного поколения бета-блокаторов. В то же время лекарственные средства, регулирующие функцию бета-рецепторов как агонистов, так и антагонистов, являются не только областью фундаментальных исследований, но и имеют большое практическое значение, оказывая влияние на течение болезни, её обострения и исходы. С ними связывают снижение числа смертельных исходов, значительное улучшение качества жизни больного человека.

Когда речь заходит о преждевременной смерти, причиной которой являются сердечно-сосу-

дистые заболевания, всегда возникает вопрос, насколько индивидуально была подобрана медикаментозная терапия (бета-блокаторы, антикоагулянты и лекарственные средства с антиаритмическим эффектом).

Тромбозы и геморрагические осложнения всегда относятся к жизнеугрожающим состояниям. На данный момент проводится 1752 клинических исследования антикоагулянтов. Активно идёт поиск новых антагонистов витамина К (варфарина, флуиндиона, асенокумарола) и проводятся клинические исследования их эффективности и безопасности. Особо перспективно внедрение в широкую клиническую практику прямых ингибиторов Ха-фактора, а также тромбина. Это новый класс антикоагулянтов, активно влияющих на гемостаз человека. Актуальной задачей терапии с фибринолитическим и антикоагулянтным эффектом является оценка рисков геморрагических осложнений. Если таковые возникли, необходимо применять эффективные антидоты для лечения жизнеугрожающих осложнений. Данное положение относится и к гепарину (как к низкомолекулярному, так и нефракционному). При целом ряде клинических ситуаций может развиваться массивная кровопотеря, которая носит ятрогенный характер. Например, описаны массивные кровотечения, возникшие после введения гепарина или приёма современных антикоагулянтов.

Большая роль в формировании современного подхода к фибринолитической терапии принадлежит кардиологу академику Е.И. Чазову. Им был разработан фибринолизин, который он испытал на себе, продемонстрировав его безопасность. С этого момента началось интенсивное применение этой группы лекарственных средств в клинике неотложных состояний, а также с целью профилактики. В настоящее время российские учёные разрабатывают новое поколение антикоагулянтных лекарственных средств.

Современная стратегия первичной, вторичной и третичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний построена на создании лекарственных средств путём изучения генома человека, протеома, липидома, молекулярно-генетических механизмов патобиологии этой группы заболеваний. По данным ВОЗ, около 30% смертельных исходов от сердечно-сосудистых заболеваний могут быть предотвращены при условии приёма современных лекарственных средств.

Другой областью интенсивных научных исследований является онкология. Среди многообразной группы онкологических заболеваний особое место занимают рак лёгких, молочной и предстательной желёз, а также колоректальный рак. В последние годы стал регистрироваться рост числа больных раком желудка, гепатобилиарной зоны. Предельно актуальной темой остаётся лейкоз и его разнообразные формы. В XX в. лечебные алго-

ритмы при онкологических заболеваниях претерпели существенные изменения.

Проводятся многочисленные клинические исследования в области онкологии: рак лёгкого – 6044 исследования, рак молочной железы – 6911, колоректальный рак – 3559, рак гепатобилиарной зоны – 1748, рак предстательной железы – 3288. Особое внимание уделяется апробации моноклональных антител, которые рассматриваются как таргетные (целевые) лекарственные средства.

Впервые моноклональные антитела в клинической практике были применены в середине 1980-х годов для лечения больных с тяжёлой формой бронхиальной астмы. Панель моноклональных антител против иммуноглобулина класса IgE была приготовлена в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (директор Р.Г. Васильев), их иммобилизацию осуществили на колонке сефадекса (С.Н. Покровский). Специфическая иммунсорбция была осуществлена в НИИ пульмонологии (Ю.С. Лебедин, А.Г. Чучалин). Практическому применению моноклональных антител предшествовали фундаментальные исследования иммунологов С. Милштейна (Аргентина) и Г. Кёлера (Германия), которые показали их прикладное значение при онкологических заболеваниях. За это открытие они вместе с Н. Джерне в 1984 г. были удостоены Нобелевской премии.

Сегодня трудно назвать тип онкологических заболеваний, при котором не применялись бы моноклональные антитела. Так, при раке уrogenитальной области и аденокарциноме поджелудочной железы панель моноклональных антител насчитывает более 10 типов. Определённые успехи достигнуты в лечении рака молочной железы, рака лёгких и при лимфомах. Относительно новым направлением стало конструирование противораковых вакцин. Проведены клинические исследования с помощью стимулятора TF-3512676, который способен вызвать активацию дендритных клеток. Вакцины апробировались на поздних стадиях мелкоклеточного рака.

Область клинического применения моноклональных антител включает онкологию, кардиологию, дерматологию, ревматологию, аллергологию, пульмонологию, офтальмологию. Можно утверждать, что моноклональные антитела найдут применение в качестве базисной терапии во всех направлениях внутренней медицины.

Ещё одна немаловажная проблема – поиск путей предотвращения резистентности к биологическим препаратам, которая в ряде случаев может формироваться достаточно быстро. Это особенно актуально для ревматологов и онкологов. Именно поэтому предлагается составить панель моноклональных антител для обеспечения индивидуального подхода к лечению больного.

В структуру хронических неинфекционных заболеваний входит хронический обструктивный бронхит. Его включение в группу социально обусловленных заболеваний основано на эпидемиологических исследованиях. Так, по данным К. Мюррея и А. Лопеса, в ближайшие 20 лет хроническая обструктивная болезнь лёгких займёт одно из лидирующих мест в структуре смертности и распространённости заболеваний у человека. Столь стремительный рост лёгочных заболеваний связывают с экологической обстановкой и высоким уровнем потребления табачных изделий. Современная фармакотерапия лёгочных заболеваний включает новое поколение лекарственных средств, влияющих на функциональную активность бета- и мускариновых рецепторов. “Золотым стандартом” считается комбинация этой группы препаратов, к которым следует отнести ингаляционные глюкокортикостероиды. В настоящее время активно ведётся поиск лекарственных средств, которые, обладая противовоспалительной активностью, были бы лишены нежелательных побочных действий терапии стероидными препаратами. Первые успехи в этой сфере уже достигнуты.

С конца прошлого столетия отмечается неуклонный рост числа больных, страдающих сахарным диабетом второго типа. Учёные постоянно ищут лекарственные средства, которые могли бы обеспечить эффективный контроль над течением болезни. Клинические исследования проводятся с ко-транспортёром 2-глюкозы-натрия (SGLT2), который ингибирует экскрецию глюкозы почками. Эта группа лекарственных средств позволяет удерживать фон эугликемии, однако при их приёме относительно часто усиливаются признаки ацидоза, что является противопоказанием к продолжению терапии. Другое направление в лечении сахарного диабета второго типа — исследование дипептидилпептидазы-4. Предполагается, что данная группа лекарственных средств снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний, но для точного заключения необходимо длительное наблюдение за больными, которые находятся на терапии дипептидилпептидазой-4. Определённый интерес представляют ингибиторы эндотелиального роста сосудов, которые могут снижать число больных с ретинопатиями. Основные перспективы в лечении сахарного диабета связывают с разработкой новых форм пролонгированного инсулина.

В научном прогнозе глобального здоровья отмечается роль современной трансплантологии. Необходимо подчеркнуть, что Россия является родиной трансплантологии, которую связывают с именем учёного-экспериментатора В.П. Демихова.

На сессии Академии наук СССР в 1951 г. он продемонстрировал успешно проведённую трансплантацию лёгких и сердца у собаки и в своём коротком выступлении очертил границы новой медицины, связанной с пересадкой органов и тканей.

В настоящее время в России достигнуты немалые успехи в трансплантологии, но особо следует выделить трансплантацию лёгких, которая осуществлена более чем у 35 больных с разными заболеваниями респираторной системы. В процессе исследования больных возник ряд вопросов, связанных в первую очередь с дисрегуляцией иммунного ответа при пересадке и в условиях активной иммуносупрессивной терапии. Совместно с группой члена-корреспондента РАН С.Д. Варфоломеева проводится изучение протеома в конденсате выдыхаемого воздуха. Получены уникальные данные, позволяющие говорить о новых биологических мишенях в раннем и позднем периодах трансплантации. Интерес вызывают динамика кератинов, появление в конденсате выдыхаемого воздуха пероксиредоксина на 10-е сутки после трансплантации (с этим белком связаны механизмы защиты слизистой дыхательных путей). Современная трансплантология нуждается в проведении фундаментальных исследований с целью защиты донорских органов от отторжения и осложнений инфекционной природы (грибки, грамотрицательные микроорганизмы, ассоциация с вирусами и формирование новой среды микробиома человека).

Научные центры мира уделяют большое внимание исследованиям в области редких болезней. Сегодня их описано свыше 15 тыс., и процесс этот продолжается. Создание орфанных лекарственных средств является одним из приоритетных направлений современных исследований. Эффективность этих препаратов демонстрируется на примере муковисцидоза. В России проведено генотипирование всех взрослых, больных муковисцидозом, осуществляется неонатальный скрининг по выявлению факта генетической предрасположенности к данной форме заболевания. За короткий промежуток времени удалось продлить жизнь больных более чем на 20 лет.

В заключение хотелось бы отметить высокие приоритеты отечественных работ по таким направлениям, как атеросклероз, трансплантология, регуляция иммунного ответа организма человека. На современном этапе требуются новые научные знания, основанные на фундаментальных исследованиях, которые могли бы лечь в основу создания нового поколения лекарственных средств.

МЕТОДОЛОГИЯ ПОИСКА И СОЗДАНИЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВ

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН С.Б. СЕРЕДЕНИНА

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

e-mail: seredeninpharm@mail.ru

Поступил в редакцию 07.12.2015 г.

К оригинальным относятся лекарственные средства, отличающиеся по структуре, механизму действия, лекарственной форме и обладающие доказанными преимуществами перед существующими препаратами. Главная цель создания оригинальных лекарств — повышение эффективности фармакотерапии. Автор рассказывает о методах поисковых исследований и разработки таких препаратов — принципе подбора физиологически активным веществам, дизайне структур, воздействующих на избранные мишени (рецепторы, ионные каналы, ферменты, шапероны, экспрессионные факторы и др.), изучении зависимости фармакологического эффекта от химической структуры, описывается содержание трёх стадий разработки оригинальных лекарств, приводятся конкретные примеры создания новых препаратов.

Ключевые слова: лекарственные средства, фармакологические мишени, поисковые, доклинические, клинические исследования.

DOI: 10.7868/S0869587316060062

К оригинальным относят лекарства, новые по структуре и свойствам и/или механизму действия с доказанным превосходством перед применяемыми средствами фармакотерапии. Разработка оригинальных лекарств принципиально отличается от создания дженериков — воспроизведённых препаратов, копий существующих, срок патента на которые завершился. В мировой практике производство дженериков — коммерчески выгодная область деятельности фармацевтических компаний, не ставящих перед собой научных задач.

Оригинальные лекарства разделяются на *первые в классе*, созданные на основе новых подходов к регуляции физиологических функций, и *гомологичные структурам известных соединений*, имеющие с ними сходные механизмы действия. Целесообразность разработки последних обосновывается фармакологическим доказательством их преимуществ.

Создание оригинальных лекарств непосредственно связано с тремя перекрывающимися друг друга областями научных исследований: *фармакологией*, в рамках которой изучается взаимодействие экзогенного соединения с организмом, выявляются механизмы формирования эффектов и их спектр, пути биотрансформации, распределения и выведения; *фармацией*, цель которой — создание лекарственного средства в виде продукта с оптимальной лекарственной формой и качественными характеристиками, необходимыми для достижения лечебного эффекта; *терапией* и относительно недавно возникшим научным на-

правлением — *клинической фармакологией*, которые осуществляют клиническую оценку эффективности лекарственного средства и побочных действий, создают оптимальные схемы применения лекарства у человека с учётом индивидуальной чувствительности.

История создания лекарственных средств насчитывает не одно тысячелетие. Психоактивные и обезболивающие вещества были известны ещё в глубокой древности, как и яды, большинство из которых имеют природное происхождение и получают из растений или организмов животных. Первое систематическое описание лекарственных средств, данное Галеном, относится ко II в. н.э. В честь автора описания они получили название “галеновых препаратов” — термин, до сих пор используемый в фармакологии для обозначения лекарственных средств, экстрагируемых из растительного сырья.

Первые фармакопеи появились в средние века в Италии, Англии, Франции, в XVIII в. — в России. Новой вехой стало выделение из растений очищенных алкалоидов, в частности, получение морфина из опиума в 1805 г. Далее появились атропин, кокаин, дигоксин, эфедрин, резерпин и другие фармакологически активные вещества. С прогрессом медицинской химии, особенно с развитием синтеза на основе природных соединений, научились синтезировать препараты со значительно оптимизированными фармакологическими свойствами. Аналогичное фармакологическое развитие получили открытия в области изучения химической структуры физиологически активных

СЕРЕДЕНИН Сергей Борисович — академик, директор НИИ фармакологии им. В.В. Закусова.

эндогенных соединений, например биогенных аминов, стероидных гормонов, инсулина.

К настоящему времени основными подходами к получению фармакологически активного вещества являются химический синтез и биотехнологическое производство. Дальнейшее развитие фундаментальной науки и методической базы существенно расширяет возможности изыскания фармакологически активных соединений. Вместе с тем компьютерное моделирование, геномные технологии, высокопродуктивный скрининг и другие методы, способствуя совершенствованию поиска, не упраздняют ранее сложившихся подходов. Так, фармакологи в КНР при помощи современных методов изучают состав продуктов традиционной медицины, выделяя активные соединения. Нобелевская премия по физиологии и медицине 2015 г. подтверждает возможность получения таким образом важных инновационных результатов: вторая часть премии была вручена китайскому фармакологу Ю. Ту за открытие новых методов борьбы с малярией. Китайская исследовательница опиралась на изучение средств традиционной медицины, одно из которых – полынь – стало основой для разработки нового антималярийного препарата.

Фармакологическую разработку можно разделить на три этапа: поисковый, доклинический и клинический. Первый – главный и наиболее сложный – состоит в определении мишени фармакологического воздействия и выборе эндогенных соединений-регуляторов, терапевтический эффект которых представляется наиболее перспективным. Этот этап включает патофизиологические, биохимические и генетические исследования с выявлением изменений механизмов регуляции, определяющих патологическое состояние, и конкретной мишени в системе зафиксированного механизма – рецептор, ионный канал, фермент, экспрессионный фактор, шаперон, элементы генетического аппарата и т.д., подлежащей фармакологическому воздействию. Идея нового лекарственного препарата может быть сформулирована и в рамках фармакологических исследований, и возникнуть как экспликация достижений физиологии и генетики, биохимии, патофизиологии и других фундаментальных наук. Когда идея сформулирована, обращаются к методам биоинформатики; концепция экзогенного регулятора формируется путём компьютерного конструирования на основе данных о связывающих участках мишени, установленных с получением кристаллов и использованием рентгеноструктурного и других методов анализа. Следующий шаг – синтез соединений, при этом также используются компьютерные программы, предсказывающие активность и токсичность соединений. Однако практически значимыми данные становятся при оценке закономерности структура–эффект в опытах *in vitro* и *in vivo*. Вне организма доказывається механизм действия, анализируются вклю-

чѐнные рецепторы, системы трансдукции сигнала, основные формы клеточных ответов, фосфорилирование эффекторных белков, изменения генной экспрессии. В опытах *in vivo* характеризуется фенотип фармакологического эффекта, спектр действия и, что особенно важно, доказываются преимущества анализируемого соединения перед известными препаратами по спектру фармакологической активности, избирательности действия, безвредности, фармакогенетическим особенностям.

Для оригинальных соединений на поисковом этапе важна токсикологическая характеристика, основанная на принципах именно лекарственной токсикологии, предусматривающей определение соотношения эффективных и токсичных доз, описание картины токсичности. Принимая во внимание тот факт, что лишь в редких случаях препарат влияет на одну мишень, необходимо уже на поисковом этапе учитывать возможность мультитаргетного действия и, прибегая к фармакологическим и токсикологическим методам, оценивать риски побочных действий. Следует также определить и экспериментально подтвердить в рамках фармакокинетических исследований возможные способы введения отобранных соединений.

Поисковый этап завершается выбором соединений – кандидатов для доклинических исследований, а углублённое изучение их фармакологических свойств проводится на втором этапе. В доклиническом исследовании определяются дозовые и временные зависимости эффектов при однократном и курсовом введении. Для этого используются адекватные, максимально трансляционные модели и различные экспериментальные методики. В ряде случаев представления о механизмах фармакологического влияния дополняются в опытах *ex vivo*. На данном этапе анализируется фармакокинетика и метаболизм препарата. Для их изучения синтезируются и рассматриваются с точки зрения фармакологической активности продукты биотрансформации. Изучается взаимодействие соединения с метаболизирующими системами с учётом их генетической гетерогенности, способности к индукции или ингибированию, что необходимо для последующих рекомендаций по индивидуальному применению и сочетанной фармакотерапии. Экспериментально исследуется возможность кумуляции, развитие толерантности, зависимости, синдрома отмены.

В доклинический этап включаются химико-фармацевтические работы, создание регламентов синтеза субстанции, выбор и изготовление лекарственной формы, разработка аналитических методов для субстанции и лекарственной формы, требуемой научно-технической документации. Для выбранной лекарственной формы определяются параметры биодоступности, характеризуются процессы распределения и выведения активного вещества и его метаболитов при избранных путях введения. Выполняется наработка препара-

та для фармакологических и токсикологических исследований.

Одной из самых важных задач, решаемых на стадии доклинических исследований, является токсикологическая оценка препарата, требующая определения параметров острой и хронической токсичности, влияния тестируемого препарата на все физиологические системы организма, возможных морфологических изменений в органах и тканях, сдвигов биохимических показателей, обусловленных его применением. Специальные исследования направлены на оценку мутагенности, канцерогенности, эмбриотоксичности, влияния на иммунную систему.

На доклиническом этапе также необходимо с использованием комплекса информативных методов провести сравнение фармакологических эффектов отобранных соединений с результатами применения лучших из уже используемых в соответствующих целях лекарств. Содержание доклинических исследований будет различаться в зависимости от типа действия нового препарата и предполагаемых сроков его применения. Однако итогом в любом случае является заключение об эффективности, безвредности и ожидаемых на основе полученных экспериментальных данных преимуществах созданного продукта.

Третий этап разработки оригинального лекарственного препарата — клинические исследования — в свою очередь распадается на три стадии. На первой на здоровых добровольцах оцениваются переносимость препарата и его фармакокинетика. Далее подтверждают экспериментально установленную эффективность препарата и выявляют особенности его действия на ограниченном контингенте больных с определённой патологией. Именно на второй стадии решается вопрос о выборе эффективных доз. Третья стадия — по сути, расширенное клиническое исследование, в котором доказываются эффективность и преимущества нового средства в сравнении с референтными препаратами. При положительных результатах клинических исследований фармакологическая разработка завершается регистрацией нового лекарственного средства и утверждением инструкции по его применению.

Следует отметить, что ни один из описанных выше этапов не может быть алгоритмизирован. Фундаментальность исследования определяется новизной объекта изучения не только на поисковом, но и на доклиническом и клиническом этапах, поэтому предсказать, какие процедуры потребуются, не представляется возможным.

В качестве иллюстрации подходов к фармакологической разработке “от мишени до лекарственного средства” можно привести серию работ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, посвящённых фармакологии тревожных расстройств и нейропротекции.

Хорошо известно, что эмоционально-стрессовые воздействия, фрустрирующие факторы, пре-

одоление которых не достигается в течение длительного времени, провоцируют возникновение тревожных расстройств, депрессии, нейродегенеративных заболеваний, сосудистых катастроф, приводящих в свою очередь к развитию нейродегенеративных процессов.

Конверсия эмоционального стресса в клеточные ответы, по современным представлениям, включает следующие события. Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы сопровождается увеличением продукции провоспалительных цитокинов на периферии и в микроглии. Возникают окисленные формы катехоламинов, глутаматная эксайтотоксичность. Повышается продукция активных форм кислорода, разобщается окислительное фосфорилирование в митохондриях, появляются белки с нарушенной 3Д-конформацией, развивается эндоплазматический стресс. Повреждается структура ДНК и начинается экспрессия белка P53, инициирующего процессы апоптоза. На основе данных о патологических изменениях в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова были определены фармакологические мишени и разработаны эффективные оригинальные лекарства:

- феназепам — транквилизатор, снижающий тревогу за счёт взаимодействия с безодизепиновым участком ГАМКА-рецептора, усиливающий трансмиссию основного тормозного медиатора ГАМК;

- мексидол — антиоксидант, восстанавливающий физиологические уровни свободно-радикальных продуктов в клетке;

- ноопепт — стимулятор когнитивных функций, обладающий комплексом нейропротекторных свойств, активирующий экспрессионный фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1), который вызывает экспрессию более 100 генов, контролирующих увеличение анаэробного гликолиза, ангиогенез, продукцию NO и вазодилатицию, эритропоз, активацию дыхания, стимулирующий образование нейротрофинов.

В 2006 г. в медицинскую практику был внедрён анксиолитик афобазол, первый лигандный активатор шаперона — σ_1 рецептора, имеющего множественные цитопротекторные функции. Этот препарат являлся приоритетной разработкой и к настоящему времени полностью доказал свою эффективность.

Сегодня в стадии разработки находятся низкомолекулярные соединения, обладающие свойствами нейротрофинов, но в отличие от них фармакологически пригодные и свободные от побочных действий нативных NGF и BDNF. Кроме того, синтезированы и фармакологически изучены соединения, тропные 18KD белку, который осуществляет транспорт холестерина в митохондрии и служит источником образования эндогенных нейростероидов с анксиолитическими и нейропротекторными свойствами.

Востребованность лекарственных средств, разработанных НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, на территории РФ

Препарат	Объём продаж															
	2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013	
	млн. руб.	млн. упаковок	млн. руб.	млн. упаковок	млн. руб.	млн. упаковок	млн. руб.	млн. упаковок	млн. руб.	млн. упаковок	млн. руб.	млн. упаковок	млн. руб.	млн. упаковок	млн. руб.	млн. упаковок
Мексидол	1480	4.17	1490	4.54	1710	4.7	1810	5.47	1920	9.7	2600	11	3000	11.3	3100	11.3
Феназепам	135	10.74	416.2	7.22	528.3	6.68	609.6	6.59	604.6	16	720	15	700	13.6	550	13.6
Афобазол	35	0.16	222.6	1.79	417.2	2.42	636	3.07	738.1	4	700.8	4.5	900	5.2	1000.4	5.2
Пикамилон	100	3.05	107.7	3.12	112.2	2.79	137.8	2.98	177.3	3.4	170	3.55	180	3.15	178	3.15
Ноопепт			23.8	0.185	46.3	0.217	64.9	0.297	86.1	0.7	160.4	0.55	130	0.48	120	0.48
Ладастен							5.4	0.043	18.5	0.57	18.3	0.655	21.3	0.56	18.2	0.56
Селанк								0.0027	1.55	0.0046	1.8	0.0062	2.4	0.008	3.1	0.008
ИТОГО	1750.0		2260.3		2814.0		3263.7		3546.15		4371.3		4933.7		4969.7	

Источник. Фармэксперт.

Таким образом, уже внедрены в медицинскую практику или имеют перспективу широкого применения оригинальные лекарственные средства, способные на разных уровнях препятствовать формированию порочных кругов патологических изменений, возникающих при ряде заболеваний ЦНС, индуцируемых стрессовыми воздействиями. Для оценки востребованности лекарственных средств, разработанных НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, можно обратиться к значениям объёма продаж соответствующих препаратов за последние годы (табл.).

Сложность и комплексность фармакологической разработки определяют длительность её выполнения – принятые в мире сроки рассчитываются в пределах 10–20 лет. В современных социально-экономических условиях массовое производство и применение оригинального лекарственного средства требует взаимодействия с реальным сектором экономики. Поэтому для поисковых фармакологических работ, проводимых в научных учреждениях, первостепенное значение приобретает патентование химической структуры соединения и его свойств, что накладывает ряд ограничений на публикационную активность. Вместе с тем длительность и отсроченный период представления результатов исследований в научной литературе компенсируется большим периодом обращения лекарства.

В заключение хочу внести два предложения, направленные на повышение значимости инновационных работ по созданию и внедрению отечественных лекарств, обеспечению импортозамещения. Во-первых, представляется необходимым разработать новые критерии оценки деятельности учреждений, учитывающие медицинское значение созданных оригинальных лекарств, возможность создания на основе научных разработок новых производств и рабочих мест, повышения квалификации специалистов, налоговые поступления в госбюджет от продаж разработанных в научных учреждениях и внедрённых в медицинскую практику лекарств. Разработкой таких критериев могло бы заняться Отделение общественных наук РАН совместно с отделениями физиологических наук, химии и наук о материалах РАН, Отделением медицинских наук РАН.

Во-вторых, целесообразным было бы дополнить приказ ФАНО от 16 июня 2015 г. № 19Н “Об утверждении показателей эффективности деятельности федеральных государственных бюджетных учреждений, подведомственных Федеральному агентству научных организаций, и критериев оценки эффективности работы их руководителей, условий осуществления выплат стимулирующего характера руководителям федеральных государственных бюджетных учреждений, подведомственных Федеральному агентству научных организаций”, включив в перечень показателей инновационной деятельности реализацию основных этапов фармакологических разработок по созданию оригинальных лекарств.

ИННОВАЦИОННЫЕ ЛЕКАРСТВА: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ К ПРОИЗВОДСТВУ

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН Н.Ф. МЯСОЕДОВА

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

e-mail: nfm@img.ru

Поступил в редакцию 22.01.2016 г.

В докладе представлены результаты исследований молекулярного механизма действия пептидов семакса, селанка, простых глипролинов, которые используются для приготовления пептидных лекарственных препаратов. Излагается концепция создания аминокислотной последовательности пептидов, рассматривается их взаимодействие с рецепторными системами клетки и воздействие на транскриптом клетки, которое и формирует клеточный ответ. На основе результатов исследований разработаны фармацевтические композиции пептидных лекарственных препаратов, организовано их производство и внедрение в клиническую практику.

Ключевые слова: пептиды, лекарственные препараты, лиганды, рецепторы, транскриптом, протеом, семакс, селанк, глипролины.

DOI: 10.7868/S0869587316060074

Проблема специфичности и безопасности лекарственных средств является главной для фармакологии, и с этой точки зрения пептиды как класс физиологически активных веществ, которые оказывают регулирующее и нейромодулирующее действие на физиологические процессы организма, представляют большой интерес. Несмотря на усилия фармакологов всего мира, лекарств на основе пептидов мало. Это связано с полифункциональностью, быстрой деградацией пептидов под действием различных протеаз и сложностью и неоднозначностью механизма их действия.

Нами предложена концепция направленного конструирования пептидов с определёнными физиологическими свойствами, которая основывается на использовании структуры природных пептидов с известным физиологическим действием. За счёт структурно-функциональных исследований выделяется минимальная аминокислотная последовательность с определённым физиологическим действием, пролонгирование которого осуществляется путём присоединения на С- и N-конец пептида определённых аминокислотных остатков. Благодаря этому подходу удалось выделить группы пептидов с нейротропной [1], анальгетической [2], нейрорепрессивной [3], противовирусной активностью [4], создать ряд суб-

станций для лекарственных препаратов и сами лекарственные препараты [5]. Мы прошли трудный путь от научной идеи до получения лекарственного препарата, организации его производства и внедрения в клиническую практику.

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ

На рисунке 1, а приведена схема возможного механизма взаимодействия пептидов с клеткой, включающая взаимодействие пептидов с мембраной клетки, передачу сигнала в ядро клетки, активацию ранних факторов транскрипции, изменение транскриптома и протеома клетки. В качестве примера влияния пептидов на протеом клетки указана обнаруженная под действием семакса активация генов трофических факторов [6] и их белковых продуктов [7]. Сложность внутриклеточных процессов регуляции демонстрирует рисунок 1, б, на котором изображены регуляторные цепи одного из ранних факторов транскрипции С-МУС.

Семакс и его фрагменты, меченные тритием, специфически связываются с мембранами мозга крыс [8, 9]. Однако конкурентное связывание в присутствии агонистов и антагонистов основных нейрорецепторных систем не позволило выявить конкретные рецепторные системы, на которые воздействует семакс.

МЯСОЕДОВ Николай Фёдорович – академик РАН, заместитель директора ИМГ РАН.

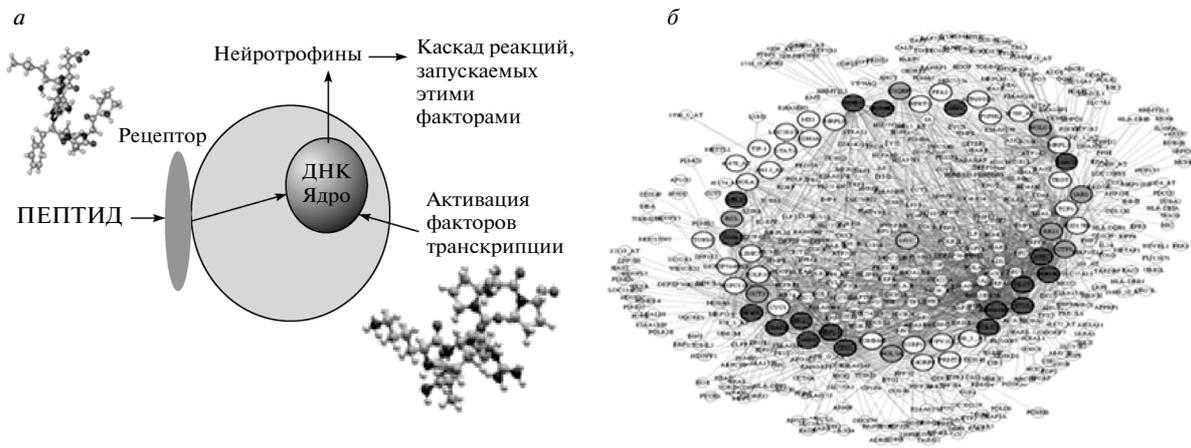


Рис. 1. Схема взаимодействия пептидов с клеткой
 а – возможные механизмы действия пептидов; б – регуляторные цепи одного из ранних факторов транскрипции

Семакс и его фрагменты воздействуют на все изученные рецепторные системы. Наши недавние исследования показали, что картина взаимо-

действия пептидов с различными рецепторными системами ещё более сложная, так как при низких концентрациях семакса и его фрагментов обна-

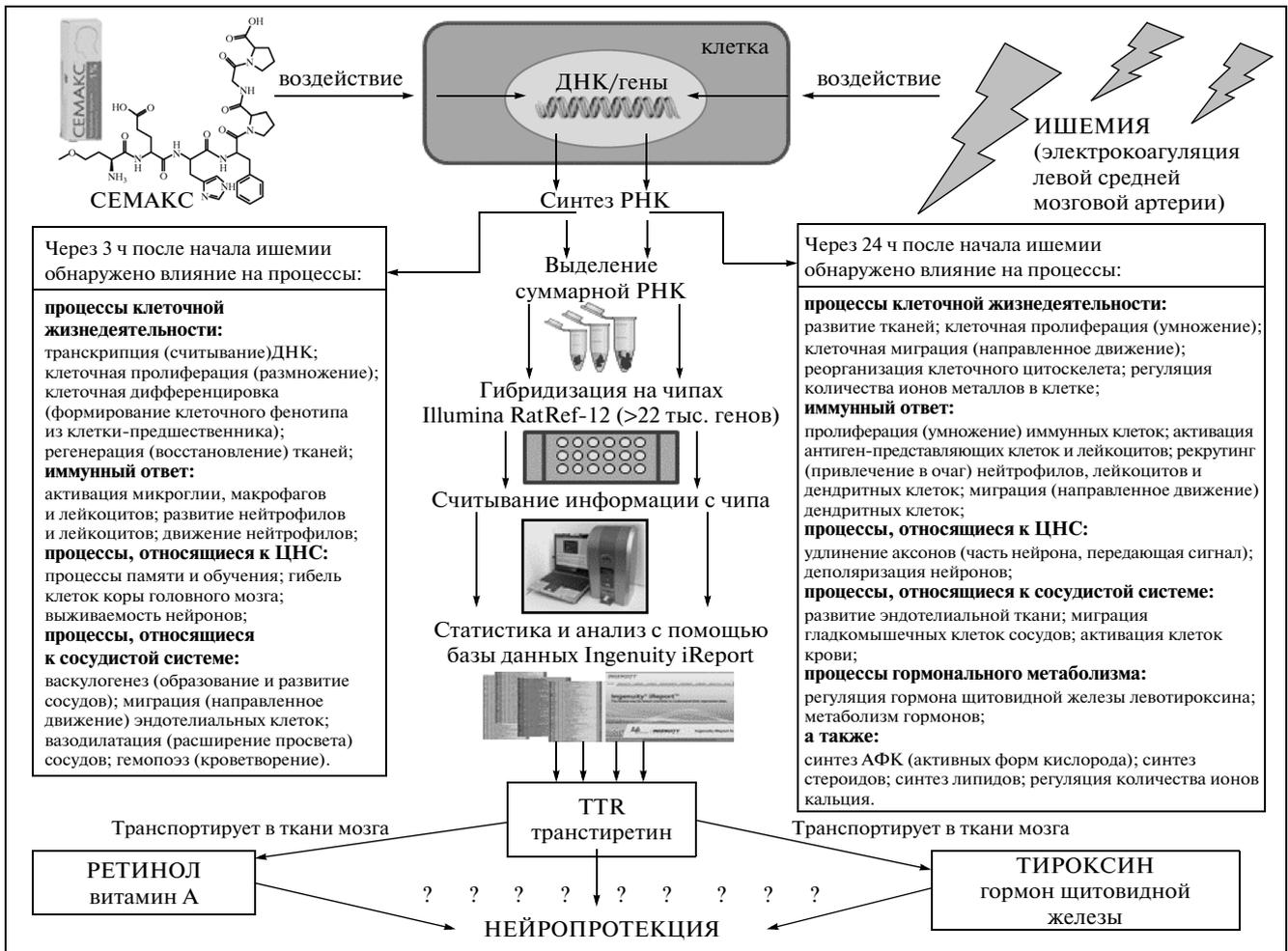


Рис. 2. Влияние пептида семакс на внутриклеточные процессы при ишемии у крыс

Таблица 1. Степень функционального восстановления (по индексу Бартела) к 30-м суткам каротидного ишемического инсульта

Исход функционального восстановления	Стандартная терапия (n = 40)	Семакс, доза		
		6 мг/сут. (n = 40)	12 мг/сут. (n = 40)	18 мг/сут. (n = 40)
Смерть	7/40(17.5%)	3/40(7.5%)	2/40(5%)#	1/40(2.5%)#
Тяжёлая инвалидизация	9/40(22.55)	4/40(10%)	2/40(5%)#	2/40(5%)#
Умеренная инвалидизация	16/40(40%)	18/40(45%)	6/40(15%)###**	7/40(17.5%)#*
Хорошее восстановление	8/40(20%)	15/40(37.5%)	30/40(75%)###**	30/40(75%)###**

Источник: применение пептидного нейропротектора семакс 1% в первые часы и дни острого церебрального инсульта (ишемия мозга). Методические рекомендации. Под редакцией директора НИИ цереброваскулярной патологии и инсульта ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, вице-президента Национальной ассоциации по борьбе с инсультом члена-корреспондента РАМН профессора В.И. Скворцовой. М., 2011.

Таблица 2. Течение и исходы дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ) при приёме семакса в разных дозах по сравнению с группами контроля, % наблюдений

Группы наблюдений	Вариант течения ДЭ		Исход	
	стабильное	прогрессирующее	ТИА	инсульт
ДЭ I (n = 32)				
6 мг/сут.	75.0*	25.0*	— **	—
9 мг/сут.	81.2**	18.7**	— **	—
Контроль I	42.9	57.1	14.3	—
ДЭ II (n = 65)				
6 мг/сут.	705.0*	30.0*	10.0	5.0*
9 мг/сут.	72.7*	27.3*	9.1	9.1
12 мг/сут.	73.9*	26.1*	8.7	— *
Контроль I	41.0	59.0	7.7	12.8
ДЭ III (n = 90)				
6 мг/сут.	53.9	46.1	7.6	7.6
9 мг/сут.	51.6	48.4	3.2*	6.4*
12 мг/сут.	54.6*	45.4*	9.1	6.1
Контроль I	36.2	64.6	13.7	15.5*

Источник: Гусев Е.И., Скворцова В.И., Чуканова Е.И. Семакс в профилактике прогрессирования и развития обострений у больных с дисциркуляторной энцефалопатией // Журнал неврологии и психиатрии. 2005. № 2. С. 35–39.

ружены новые специфические сайты связывания. Экспериментальные данные по специфическому связыванию пептидов позволяют выдвинуть предположение об аллостерическом действии пептидов на различные рецепторные системы, что приводит к изменению влияния эндогенных ортостерических лигандов и специфическим ответам клеток. Это предположение объясняет полифункциональность пептидов, а также специфичность и “мягкость” их действия.

Рассмотрим влияние пептида семакс на внутриклеточные процессы на модели фокальной церебральной ишемии у крыс, вызванной электрокоагуляцией участка средней мозговой артерии (наиболее близкой к инсульту у человека). На рисунке 2 приведена схема экспериментов [10].

У крыс вызывали ишемию, половине крыс вводили семакс, через 3 и 24 часа выводили из опыта и анализировали РНК клеток мозга животных, находящихся под ишемией и под воздействием ишемия+семакс на чипах компании Illumina, содержащих 22 тыс. крысиных генов. Чипы — это пластины, на которые нанесены олигонуклеотиды, взятые из последовательности генов известного строения. Обнаружено, что при ишемии изменили экспрессию несколько сотен генов и при воздействии ишемия+семакс ещё несколько десятков. На рисунке 2 показаны основные клеточные процессы, соответствующие генам, откликнувшимся на воздействие ишемия+семакс по сравнению с ишемизированной тканью через 3 и 24 часа. Доля генов, относящихся к иммунному

ответу, составила через 3 часа 9%, а через 24 часа 53%. Найдена также сильная активация гена транскретина, кодирующего белок, являющийся переносчиком тиронина и ретинола [11].

В случае подтверждения результатов на белковом уровне мы сможем показать, что лежит в основе нейропротективных свойств семакса (знак вопроса на рис. 2). Эти исследования согласуются с клиническими результатами в работах под руководством члена-корреспондента РАН В.И. Скворцовой и академика РАН Е.А. Гусева при лечении инсульта и терапии дисциркуляторной энцефалопатии и других неврологических заболеваний (табл. 1, табл. 2), а также с работами сотрудников Института глазных болезней РАН при терапии заболеваний центрального глазного нерва (рис. 3) (назову в первую очередь доктора медицинских наук Н.Л. Шеремет) (рис. 3, в, г). Положительное влияние семакса на когнитивные процессы, его нейропротекторная активность дали возможность использовать лекарственные препараты на основе данного пептида в терапии болезни Паркинсона, хореи Гентингтона (Научный центр неврологии РАН) [12] и на ранних стадиях болезни Альцгеймера (Научный центр психического здоровья РАН) [13]. Во всех случаях достигнут положительный эффект.

Многочисленные исследования показали важную роль пренатального и раннего неонатального периода жизни в развитии и становлении нейрофизиологических механизмов и ментальных функций. Так, у крыс, подвергавшихся в ранний период развития фармакологическому воздействию (неонатальное введение антидепрессанта флувоксамина), а также в модели неонатального стресса и острой неонатальной гипоксии увеличивается уровень тревожности, нарушается способность к обучению, изменяются нейрхимические показатели. У крыс, получавших семакс в этих условиях, наблюдалось снижение тревожности, улучшение способности к обучению, а также нормализация нейрхимических показателей. Эти данные открывают новые возможности в использовании семакса при коррекции негативных эффектов лекарственных препаратов центрального действия, особенно у детей.

В 2012 г. в Институте молекулярной генетики РАН совместно с НИИ фармакологии РАН завершена многолетняя работа по конструированию и исследованию нового лекарственного препарата селанк, а также его производству [14]. Селанк (Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro) – анксиолитик со стимулирующим действием без побочных эффектов. Он получен конденсацией пептидов тафтцина (Thr-Lys-Pro-Arg) и глипролина (Pro-Gly-Pro). Сегодня селанк применяют для лечения больных с тревожным синдромом и для лечения пациентов с органически эмоционально-лабильным расстройством. Выявлены новые по-

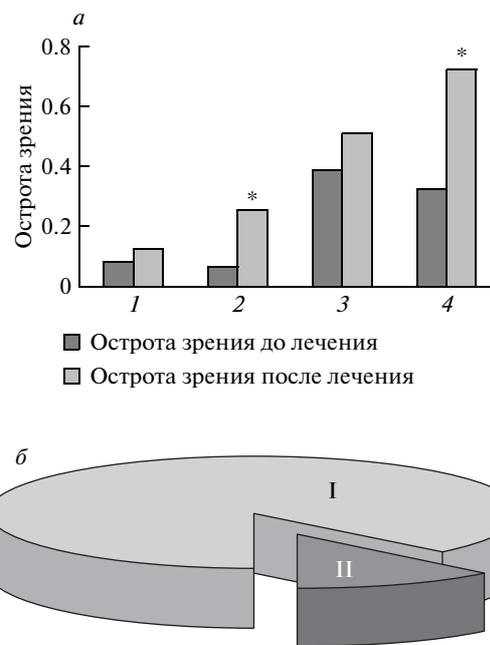


Рис. 3. Клинические данные при терапии заболеваний центрального глазного нерва препаратом семакс *а* – влияние семакса на остроту зрения у пациентов с заболеванием зрительного нерва: 1 – контрольная группа с исходной остротой зрения 0.1 и ниже; 2 – группа пациентов с исходной остротой зрения 0.1 и ниже, получавших семакс; 3 – контрольная группа с исходной остротой зрения 0.2 и выше; 4 – группа пациентов с исходной остротой зрения 0.2 и выше, получавших семакс (*Достоверные отличия от исходных значений отмечены); *б* – острота зрения через три месяца после комплексного лечения с препаратом семакс: I – 87.5% – острота зрения стабильная; II – 12.5% – острота зрения частично снизилась

Источник: Полунин Г.С., Нуриева С.М., Баялдин Д.Л. и др. Определение терапевтической эффективности нового отечественного препарата семакс при заболеваниях зрительного нерва // Вестник офтальмологии. 2000. Т. 116. № 1. С. 15–18; Шеремет Н.Л., Полунин Г.С., Овчинников А.Н. и др. Экспериментальное обоснование использования нейропротектора семакса в лечении заболеваний зрительного нерва // Вестник офтальмологии. 2004. Т. 120. № 6. С. 25–27.

казания применения препарата в неврологии, педиатрии, при вирусных заболеваниях и геморрагическом инсульте.

На рисунке 4 показаны структура и физиологические свойства этого препарата, вошедшего в клиническую практику. На рисунке 4, *а* представлена структура ГАМК(A) рецептора – основного тормозящего рецептора, регулирующего пропускание в клетку ионов Cl^- и тем самым влияющего на потенциал действия нейрона. Лигандом этого рецептора является гамма-аминомасляная кислота (GABA). Здесь же представлены аллостерические сайты связывания этого рецептора. На рисунке 4, *б* показано специфическое связывание [3H]GABA с рецепторами плазматических мембран коры головного мозга крыс, а также влияние на это связывание предварительного интраназального введения селанка или GABA. Видно, что

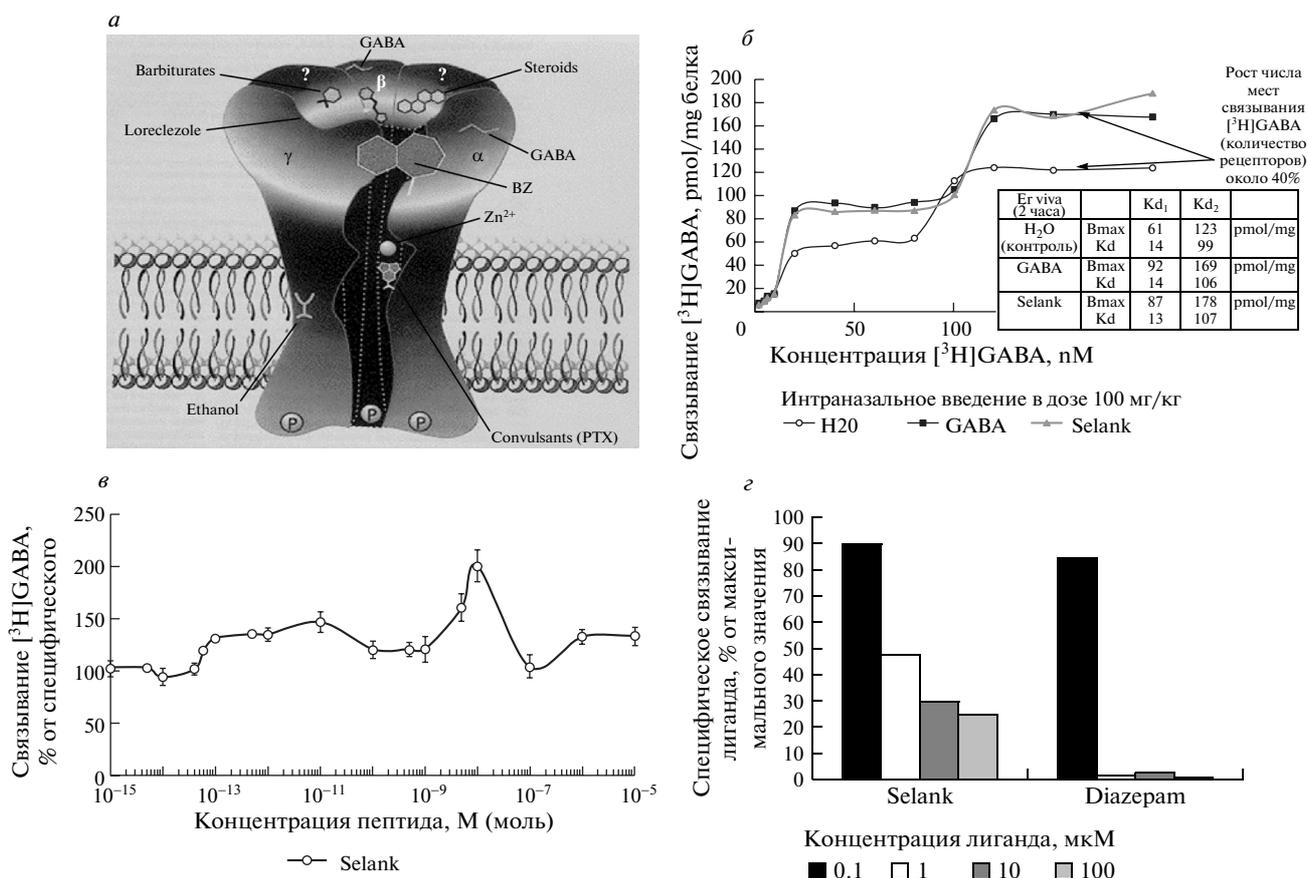


Рис. 4. Структура ГАМК(A) рецептора и взаимодействие с ним пептида селанк

a – структура ГАМК(A) рецептора; б – специфическое связывание [³H]ГАБА на плазматических мембранах коры головного мозга крысы через 2 часа после введения селанка или ГАМК; в – специфическое связывание [³H]ГАБА (20 нМ) на плазматических мембранах клеток коры головного мозга крысы в присутствии пептидов; г – специфическое связывание [³H]Диазепам (30 нМ)

предварительное введение ГАБА увеличивает связывание на 40%. При интраназальном введении селанка складывается аналогичная картина.

На рисунке 4, в изображено специфическое связывание [³H]ГАБА на плазматических мембранах клеток коры головного мозга крыс в присутствии различных концентраций селанка. На рисунке 4, в можно видеть влияние селанка в широком диапазоне концентраций на связывание ортостерического лиганда [³H]ГАБА, а также область терапевтически значимого влияния этого пептида. В случае селанка нам удалось выявить и сайты специфического связывания этого пептида. На рисунке 4, г показано конкурентное влияние селанка на связывание меченного тритием диазепам с бендиазепиновым сайтом связывания. Селанк конкурирует с диазепамом, который сам является аллостерическим регулятором.

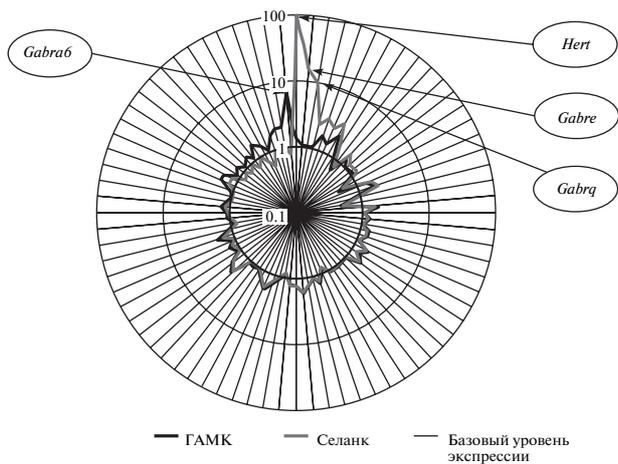


Рис. 5. Изменение экспрессии генов в мозге крысы через 3 часа после введения ГАМК и селанка

Полученные результаты послужили основой новой схемы терапии тревожных расстройств, разработанной в Научном центре психического здоровья РАН, по сочетанному применению бендиазепинов с селанком, что позволило значительно уменьшить негативные эффекты бендиазепинов, сохранив специфичность действия.

Изучено влияние селанка на внутриклеточную регуляцию. Изучались гены, вовлечённые в процессы нейрорецепции и функционирования ГАМК-эргической системы, изменение транскрипции которых под действием селанка исследовано. На рисунке 5 видно, как меняется экспрессия генов в мозге крысы через 3 часа после введения GABA или селанка. Влияние на транскрипцию генов обоих препаратов одинаково, однако селанк специфически активирует (в 100 раз) ген *Hert (hypocretin)*, который имеет важное значение для функционирования клетки, что отражено на том же рисунке. Изучено изменение транскриптома нейронов под действием пептидов. Семакс – (гены, вовлечённые в нейропротекцию) – изменение экспрессии 27 генов из 84. Селанкс – (гены, вовлечённые в противовоспалительный эффект) – изменение экспрессии 34 генов из 84. Изучено изменение транскриптома под действием пептидов Thr–Lys–Pro–Arg, Pro–Gly–Pro, Gly–Pro, Arg–Pro–Gly–Pro.

В последние годы у крыс выявлено положительное влияние глипролинов (короткие пролинодерживающие пептиды) на различные нарушения при метаболическом синдроме [15]. Метаболический синдром включает несколько факторов риска, каждый из которых способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний: повышенный уровень глюкозы в крови, триглицеридов, общего холестерина и липопротеидов низкой плотности, ожирение, повышенное давление, слипаемость тромбоцитов. Пептиды нормализуют эти показатели, влияя на параметры гемостаза, показатели липидного профиля, уровень глюкозы, изменение массы тела.

На основе этих работ отобран тетрапептид Pro–Gly–Pro–Leu (глипропол) в качестве кандидата для создания лекарства. Завершены доклинические исследования и первая фаза клинических исследований.

Мишенью действия пептидов, приводящего к позитивным терапевтическим эффектам, могут служить как рецепторные системы, в основном за счёт аллостерических сайтов связывания, так и направленное изменение транскриптома за счёт изменения активности определённых генов. Если воздействие на определённые рецепторные системы уже давно является одной из задач фармакологии, то активация определённых генов, вызывающая направленное изменение протеома и, как следствие, определённые физиологические ответы, – новая область фармакологии, новая мишень фармакологического воздействия. Физиологически активные пептиды служат наиболее приемлемым инструментом такого воздействия.

ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ

Пептидные лекарственные препараты представляют собой наукоёмкий продукт. Терапевтический эффект для пептида семакс достигается при дозе ~0.5 мг/сутки, а селанка ~0.75 мг/сутки. Вся потребность страны и экспорта в лекарствах на основе пептида, например семакса, составляет ~3.5 кг/год. При организации производства лекарственных препаратов на основе пептидов семакса, селанка и других всё приходилось создавать впервые, включая разработку нормативной документации. В настоящее время его фармацевтическое производство «Инновационным научно-производственным центром “Пептоген”» (ЗАО «ИНПЦ “Пептоген”») лицензировано по GMP и уже само участвует в решении технологических вопросов создания новых препаратов.

Среди организаций, с которыми мы сотрудничали и без которых эта работа была бы невозможна, – Научный центр психического здоровья РАМН, биологический факультет и факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Институт молекулярной генетики РАН, Научный центр здоровья детей РАМН, Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Поскольку разработка новой химической структуры, лекарств, организация производства и маркетинг занимают минимум 10–15 лет, требуют больших материальных затрат и в любой момент могут дать отрицательный результат, необходима государственная поддержка как в фундаментальной, так и в технологической части. И если фундаментальные исследования, в результате которых появляются новые мишени, новые структуры и механизмы их действия, ещё удаётся проводить на долговременной грантовой основе, то всё остальное, начиная с доклинических исследований, возможно только в рамках долгосрочных государственных программ.

В заключение хотелось бы вспомнить участников этой работы, внёсших большой вклад в её выполнение и уже ушедших из жизни, академика И.П. Ашмарина, кандидата химических наук В.Н. Незавибатько, кандидата химических наук М.А. Пономарёву-Степную.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Алфеева Л.Ю., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Дубынин В.А., Каменский А.А., Козловская М.М., Левицкая Н.Г., Мясоедов Н.Ф., Незавибатько В.Н., Середенин С.Б. Семейство пептидов, обладающих нейротропными свойствами // Патент РФ № 2206573.

2. Алфеева Л.Ю., Андреева Л.А., Воронина Т.А., Гузевых Л.С., Емельянова Т.Г., Мясоедов Н.Ф., Серединин С.Б. Семейство пептидов, обладающее анальгетической активностью // Патент РФ № 2286169.
3. Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Кост Н.В., Мешавкин В.К., Воронина Т.А., Гарибова Т.Л., Серединин С.Б. Средство, обладающее антипсихотической активностью // Патент РФ № 2411248.
4. Андреева Л.А., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., Щербенко В.Э., Еришов Ф.И., Мясоедов Н.Ф. // Патент РФ № 2411249.
5. Kolomin T., Shadrina M., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N. A new generation of drugs: synthetic peptides based on natural regulatory peptides // *Neuroscience & Medicine*. 2013. V. 4. № 4. P. 223–252.
6. Shadrina M.I., Dolotov O.V., Grivennikov I.A., Slominsky P.A., Andreeva L., Inozemtseva L.S., Limborska S.A., Myasoedov N.F. Rapid induction of neurotrophin mRNAs in rat glial cell cultures by Semax, an adrenocorticotrophic hormone analog // *Neuroscience Letters*. 2001. V 308. P. 115–118.
7. Dolotov O.V., Karpenko E.A., Inozemtseva L.S., Seredenina T.S., Levitskaya N.G., Rozycka J., Dubynina E.V., Novosadova E.V., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., Kamensky A.A., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Engele J. Semax, an analog of ACTH(4–10) with cognitive effects, regulates BDNF and trkB expression in the rat hippocampus // *Brain Res*. 2006. 1117. P. 54–60.
8. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф. Взаимодействие трипептида Pro-Gly-Pro, меченного по С-концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами мозга крыс // Доклады АН. 2008. № 1. С. 136–137.
9. Bezuglov V.V., Akimov M.G., Gretskaya N.M., Surin A.M., Pinelis V.G., Shram S.I., Vyunova T.V., Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. The Study of the Neurotropic Peptides Role in Cell Responses Regulation // *Horizons in Neuroscience Research*. 2015. V. 21. P. 151–170. ISBN: 978-1-63482-967-0.
10. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Limborska S.A., Skvortsova V.I., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: Genome-wide transcriptional analysis // *BMC Genomics* 2014. 15(1). 228. P. 1–12.
11. Медведева Е.В., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф., Дергунова Л.В. Положительное воздействие препарата семакс на экспрессию гена транстиретина в мозгу крыс на модели фокальной ишемии // Сборник тезисов докладов VII Российского симпозиума “Белки и пептиды”. Новосибирск, 2015.
12. Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Никольская Н.Н., Тимербаева С.Л., Инсарова Н.Г., Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Каменский А.А., Рясина Т.В., Мясоедов Н.Ф. Способ лечения Хореи Гентингтона // Патент РФ № 2136309.
13. Мясоедов Н.Ф., Гаврилова С.И., Калын Я.Б., Колыханов И.В., Михайлова Н.М., Селезнёва Н.Д., Соколова О.Н., Тиганов А.С., Андреева Л.А. Средство и способ профилактики и лечения пациентов с болезнью Альцгеймера // Патент РФ № 2384343.
14. Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С., Кост Н.В., Габаева М.В., Соколов О.Ю., Серебрякова Е.В., Сиранчиева О.А., Андриющенко А.В., Телешова Е.С., Сюняков С.А., Смулевич А.Б., Мясоедов Н.Ф., Серединин С.Б. Эффективность и возможные механизмы нового пептидного анксиолитика селанка при терапии генерализованного тревожного расстройства и невращения // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. № 4. С. 38–48.
15. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Андреева Л.А. Современная концепция регуляторной роли пептидов глипролинового ряда в коррекции функции системы гемостаза при развитии сахарного диабета // Известия РАН. Серия биологическая. 2013. № 4. С. 453–462.

НОВЫЙ КЛАСС ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН С.М. АЛДОШИНА^а, ДОКТОРА ХИМИЧЕСКИХ НАУК
Н.А. САНИНОЙ^а, АКАДЕМИКА РАН М.И. ДАВЫДОВА^б, АКАДЕМИКА РАН Е.И. ЧАЗОВА^с

^а Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия

^б Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ, Москва, Россия

^с Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ, Москва, Россия

e-mail: smaldoshin@presidium.ras.ru; sanina@icp.ac.ru; ronc@list.ru; cclibr@cardio.ru

Поступил в редакцию 25.01.2016 г.

Статья посвящена новому классу доноров оксида азота — безопасным лекарственным средствам для терапии социально значимых заболеваний. Эта комплексная работа выполнена в кооперации ряда институтов Российской академии наук с Российским кардиологическим научно-производственным комплексом и Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина.

Ключевые слова: доноры оксида азота, эндотелиальные клетки, NO-терапия, нитрозильные негемовые протеины.

DOI: 10.7868/S0869587316060086

Формирование инновационных подходов к лечению различных социально значимых заболеваний, включая дизайн и изучение механизмов действия принципиально новых классов соединений, которые были бы более эффективны и безопасны для здоровья человека, чем существующие лекарственные средства, является приоритетной задачей современной медицинской науки [1]. Молекула оксида азота(II) NO, будучи простой по составу, обладает удивительными свойствами. В 1980-х годах было обнаружено, что она может выделяться из эндотелиальных клеток и вызывать расширение сосудов, а в 1992 г. она была названа “молекулой года”. В 1998 г. трое учёных — Ф. Мюрад, Р. Фарчготт и Л. Игнарро — получили Нобелевскую премию по медицине за открытие роли оксида азота(II) как сигнальной молекулы в кардиоваскулярной системе. В настоящее время доказано, что молекула NO — это новый мессенджер в клетках живых организмов. Она является сигнальной молекулой в различных физиологических и биохимических процессах, неотъемлемым компонентом сердечно-сосудистой системы и участвует в регулировании генетического аппарата на уровне ДНК-транскрипции и трансля-

ции. Отличительными чертами молекулы NO является то, что она имеет неспаренный электрон, представляет собой газообразный радикал с коротким временем жизни и чрезвычайно высокой реакционной способностью. При взаимодействии её с анионом O²⁻ образуется пероксинитрит, который является патогеном для организма.

Биологическая значимость молекулы NO зависит от концентрации, в которой она находится в организме [2]. При низких концентрациях (<150 нМоль) она выполняет регуляторные функции, а именно, регулирует проницаемость и тонус сосудов, клеточную адгезию, иммунную систему, метаболизм в печени, функцию почек, эрекцию, синаптическую адаптацию, нейротрансмиссию, влияет на память и обучаемость. При повышении концентрации (>150 нМоль) она приобретает защитные качества, включающие цитотоксическую защиту, антираковую, антиоксидантную, антибактериальную и антималярийную активность, подавление лейкоцитов, снижение давления. Наконец, при избытке (>1000 нМоль) NO вызывает патологии, в частности, повышение чувствительности клеток к токсичности металлов, радиации, пероксидному окислению липидов и т.д. Поэтому многие состояния и болезни нашего организма, такие как повышенное кровяное давление, ишемическая болезнь, астма, рак, иммунодефицит, нейродегенеративные заболевания, связаны с изменением количества эндогенного NO.

АЛДОШИН Сергей Михайлович — академик РАН, директор ИПХФ РАН. САНИНА Наталия Алексеевна — доктор химических наук, заведующая отделом строения вещества ИПХФ РАН. ДАВЫДОВ Михаил Иванович — академик РАН, директор РОНЦ им. Н.Н. Блохина. ЧАЗОВ Евгений Иванович — академик РАН, научный руководитель РКНПК МЗ РФ.

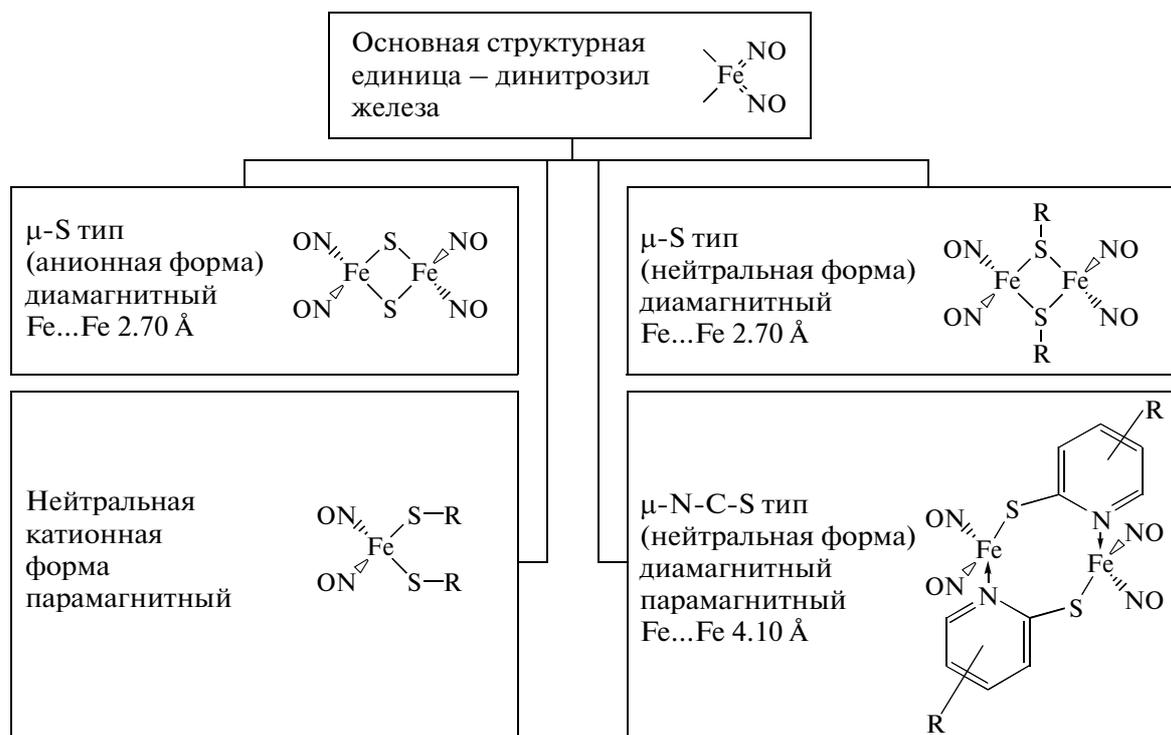
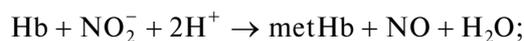
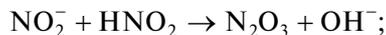
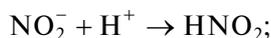


Рис. 1. Структурные принципы образования биядерных нитрозильных комплексов железа

In vivo молекула может образовываться двумя способами. Во-первых, неферментативным путём:



Во-вторых, ферментативным, который обусловлен влиянием ферментов (так называемых NO-синтаз) и связан с образованием молекулы NO путём сложных химических превращений из аргинина.

Подход к созданию лекарственных средств на основе эндогенных NO-препаратов базируется либо на анти-NO терапии (создание ловушек для избыточных молекул NO в организме или ингибирование активности NO-синтаз), либо на NO-терапии (создание препаратов, которые могут своевременно доставлять NO в определённые участки организма) [3].

В наших исследованиях использовался биомиметический подход. Известно, что в организме эта быстрая молекула с очень большой константой диффузии может накапливаться в активных центрах негемовых протеинов [4]. Мы решили

смоделировать структуру негемовых протеинов и понять, как этот процесс протекает в живом организме. Ранее было известно лишь то, что молекула NO может модифицировать структуру активного центра негемового протеина и приводить к образованию моноядерных комплексов, структура которых была неизвестна. Профессор С.И. Ваннин показал, что моноядерный комплекс имеет сигнал в спектре электронного парамагнитного резонанса с g-фактором 2.03, и до наших исследований эти комплексы так и назывались — молекулы с g-фактором 2.03. В результате синтетических исследовательских работ удалось получить весь набор комплексов, которые моделируют структуру активных центров негемовых протеинов.

Кроме того, в исследованиях мы использовали различные S-лиганды, которые являются ингибиторами роста опухолей, обладают противовоспалительными и антибактериальными свойствами, некоторые из них являются природными тиолами. Механизм образования нитрозильных комплексов железа показан на рисунке 1. Основная структурная единица, динитрозил железа, может комбинироваться в биядерные и моноядерные соединения посредством связывания через различные мостики, в основном содержащие атомы серы.

Несмотря на простоту геометрического строения молекул, они имеют чрезвычайно сложное электронное строение. Дж. Энемарк и Р. Фелтам

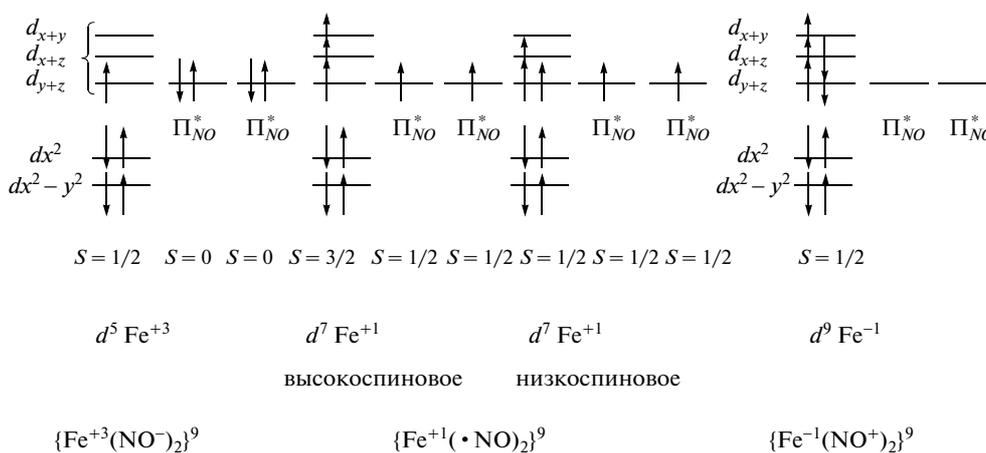


Рис. 2. Строение $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^9$ узла

[5] предложили определять эти молекулы по сумме d-электронов на атоме железа и неспаренных электронов на NO-группах, так как происходит очень лёгкое обратимое перетекание электронной плотности с атома железа на NO-группы.

На рисунке 2 показано формальное электронное строение возможных электронных состояний. Молекулы NO могут выступать либо как NO^- , нитроксильные анионы, либо как NO^+ , нитрозониевые катионы, либо как нейтральные молекулы радикальной формы. Вопрос электронного строения Fe–NO связи является принципиальным, потому что именно её особенности и определяют реакционную способность молекулы, механизм и кинетику выделения молекул NO. Возможны разные состояния окисления и разное количество неспаренных электронов на узле $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}$. Магнитные исследования соединений показали, что на этом узле находится только один неспаренный электрон. Были проведены прецизионные рентгеновские исследования нитрозильных комплексов [6]. На рисунке 3 приведено экспериментальное распределение электронной плотности, которое показывает особенности строения этих молекул. Экспериментально показано, что суммарный заряд на атомах в группе NO составляет всего $-0.2-0.3$ e, то есть молекула NO находится в нейтральной радикальной форме.

Квантово-химические исследования подтвердили этот вывод и показали, что необычное строение Fe–NO связи обусловлено тем, что два электрона в NO группах антиферромагнитно спариваются с двумя из трёх неспаренных электронов железа с образованием так называемой гомеоплярной связи, при которой электроны не обобществляются, находясь в своих ядрах, но за счёт сильного антимагнитного взаимодействия магнитный момент у них зануляется, поэтому ядро имеет один неспаренный электрон, который локализуется атомами железа [7].

Чтобы проверить полученный вывод, были проведены прецизионные исследования особенностей строения этой связи, в том числе топологический анализ распределения функции электронной плотности на связи, градиента электронной плотности и второй производной электронной плотности [8]. Показано, что это гомеоплярная связь, но с высокой энергией, примерно 30–40 ккал/моль. Было неясно, каким образом при прочной связи Fe–NO происходит активное, без дополнительного инициирования, выделение NO в организме. Для ответа на этот вопрос определены количественные характеристики выделения NO *in vitro* в зависимости от структуры молекул [9]. Все полученные нитрозильные комплексы железа являются эффективными донорами NO в организме.

Для того чтобы понять, почему при такой прочной связи происходит активное выделение NO, мы провели квантово-химическое моделирование динитрозильных комплексов железа и показали, что в физиологическом растворе огромную роль играют молекулы воды, упрощающие выделение молекулы NO (оно происходит с выделением энергии) [10]. С увеличением количества молекул воды, которые координируют с центральным атомом железа, прочность Fe–NO связей понижается, что приводит к лёгкому выделению NO.

Не все полученные комплексы оказались водорастворимыми. Теоретические исследования показали, что молекулы из нерастворимой нейтральной формы можно восстановить в солевую водорастворимую и устойчивую форму [11].

Была изучена кардиотропная активность водорастворимых нитрозильных комплексов [12, 13]. Известно, что молекулы NO играют существенную роль в регуляции сосудистого тонуса и метаболизма миокарда. Недостаточное образование NO ведёт к развитию эндотелиальной дисфунк-

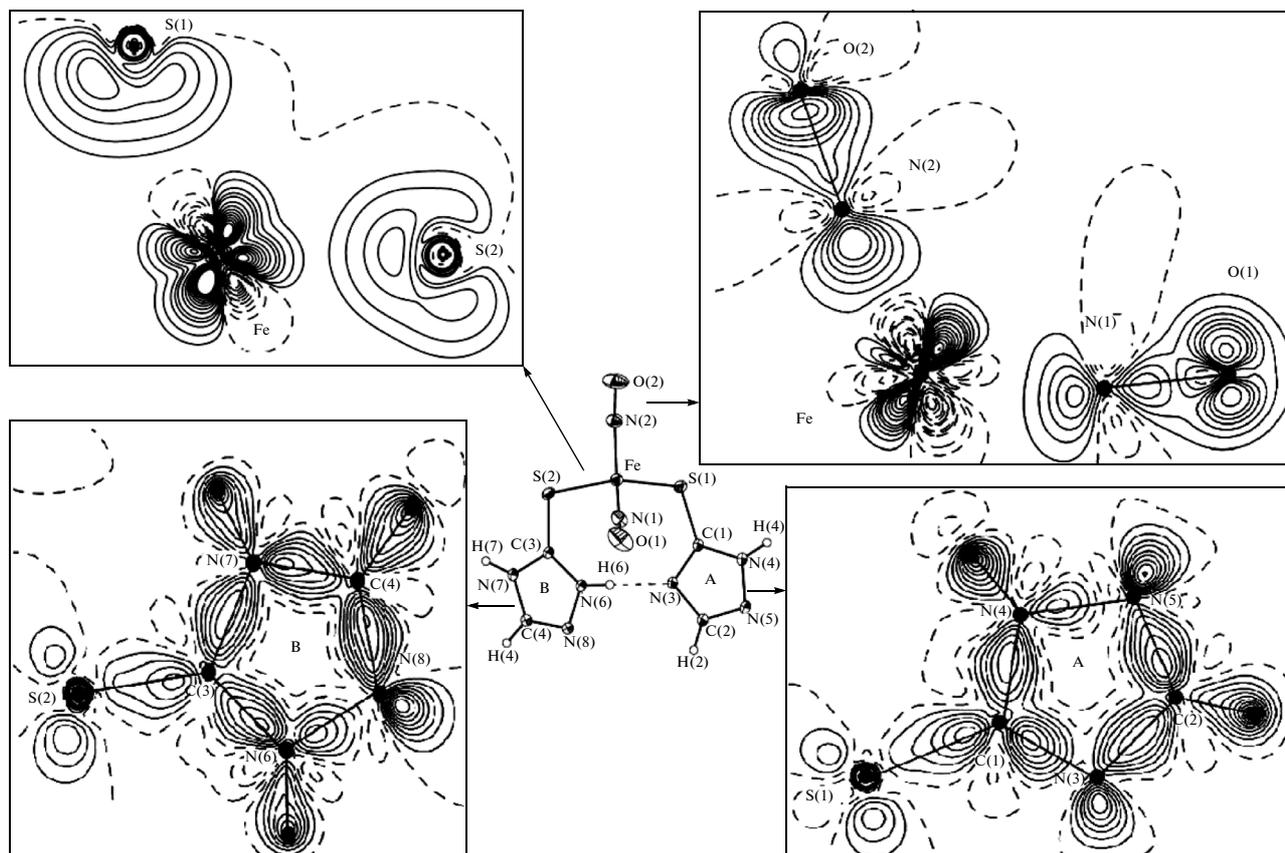


Рис. 3. Прецизионные рентгеновские исследования нитрозильного комплекса железа с 2-меркаптотриазолом

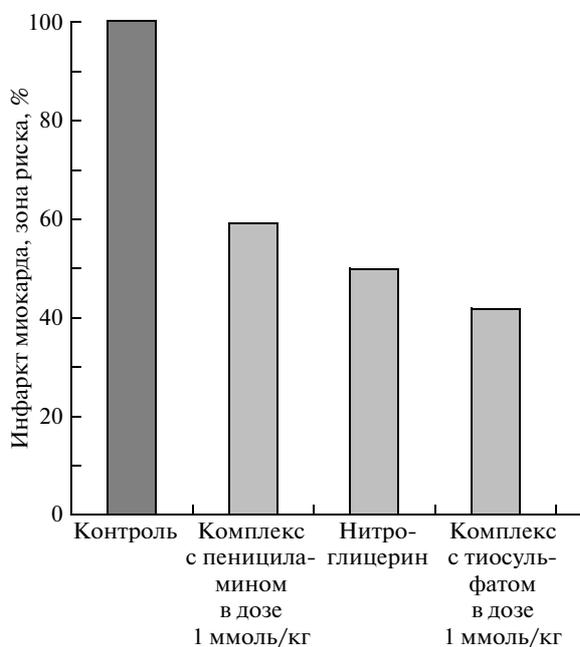


Рис. 4. Ограничение размеров инфаркта миокарда биядерными нитрозильными комплексами железа μ -S структурного типа в сравнении с нитроглицерином

ции, которая в свою очередь повышает тонус коронарных сосудов. Это сказывается на росте агрегации и адгезии и стимулирует развитие так называемого синдрома “no-reflow” и приводит к ухудшению тока крови.

Проведены исследования на изолированном реперфузированном сердце и *in vivo* на моделях ишемии сердца. Впервые обнаружена высокая кардиотропная активность полученных нами препаратов. Установлено, что все исследованные доноры NO этого класса улучшают восстановленные одноминутного объёма по сравнению с контролем. Коронарный поток и интенсивность сократительных функций при использовании комплексов существенно выше, чем в случае использования соединений, которые в настоящее время применяются для терапии сердечно-сосудистых заболеваний (например, нитропрусида). Кроме того, существенно увеличивается содержание метаболитов в сердце крысы в конце реперфузии. Показано, что защитные действия этих комплексов сопровождаются улучшением восстановления аэробного метаболизма в миокарде при реперфузии.

На рисунке 4 показано *in vivo*, что синтезированные доноры NO существенно ограничивают

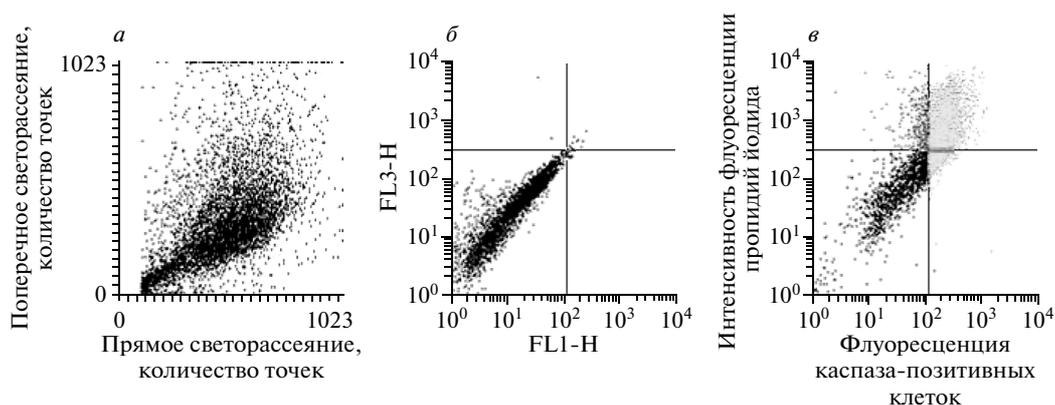


Рис. 5. Результаты анализа флуоресцентного сигнала в опухолевых клетках человека линии K562, индуцированных комплексом с цистеамином

a – графическое изображение в координатах прямого (FSC) и поперечного (SSC) светорассеяния индуцированных неокрашенных клеток линии K-562 (контроль); *б* – аутофлуоресценция индуцированных неокрашенных клеток в зелёном (FL1-H) и красном (FL3-H) каналах цитофлуориметра; *в* – флуоресценция индуцированных окрашенных клеток

размер инфаркта миокарда. Для сравнения продемонстрировано влияние нитроглицерина и синтезированных нитрозильных комплексов железа по сравнению с контролем.

В Российском кардиологическом научно-производственном комплексе первую стадию клинических испытаний прошёл препарат оксаком, который является двудерным комплексом железа с глутатионом (Glu) [14]. Это новый вазодилатор, эндогенный донор NO, который показал высокую антигипертензивную активность с продолжительностью действия более восьми часов без выраженных побочных эффектов.

Совместно с Институтом биохимической физики РАН были изучены молекулярно-генетические механизмы канцеролитической активности доноров NO [15, 16]. В модельной системе *E. coli* впервые определены молекулярно-генетические механизмы цитотоксического и мутагенного действия синтетических нитрозильных комплексов железа. Показано, что основной механизм, приводящий к апоптозу через активацию каскада каспаз, связан с одно- и двухнитиевым разрывом ДНК.

Проводились экспериментальные исследования совместно с Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина по изучению возможности использования доноров NO как эффективных, нетоксичных, неплатиновых препаратов, которые в настоящее время являются наиболее значимыми для химиотерапии раковых заболеваний. Было отобрано 15 нитрозильных комплексов железа, доноров NO, проведено их тестирование на линиях опухолевых клеток человека различного гистогенеза [17]. Экспериментально доказан механизм противоопухолевой активности этого класса доноров NO – апоптоз опухолевых клеток (рис. 5). Показано, что цито-

токсическая активность тестируемых комплексов зависит от их структуры, то есть через структуру можно регулировать их свойства. Также проведены исследования *in vivo* четырёх основных структурных типов синтезированных соединений, продемонстрировавших наибольшую цитотоксичность (по результатам МТТ-тестирования), показана их высокая противораковая активность на экспериментальных моделях опухолей мышей [18–20]. По результатам проведённых исследований был отобран препарат, представляющий собой нитрозильный комплекс с цистеамином. В настоящее время он проходит стадию предклинических испытаний. Препарат имеет избирательную цитотоксическую активность в отношении линии опухолевых клеток различного гистогенеза.

Таким образом, все синтезированные соединения оказались эффективными донорами NO, которые проявляют себя в лечении как сердечно-сосудистых, так и раковых заболеваний. На сегодня отобраны три препарата, два из которых – комплексы с пеницилламином и тиосульфатом – могут использоваться для NO-терапии острого коронарного синдрома, третий (с цисте-амином) – для NO-химиотерапии (аденокарцинома толстой кишки Akatol, меланома В16, аденокарцинома Ca-755, карцинома лёгкого Льюис).

Поняв механизм работы активных центров нитрозильных негемовых протеинов, мы сможем создавать лекарственные препараты нужной структуры и прогнозируемых свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Morphy R., Kay C., Rankovic Z. From magic bullets to designed multiple ligands // Drug Discovery Today. 2004. № 9. P. 641–651.
2. Szacilowski K., Chmura A., Stasicka Z. Interplay between iron complexes, nitric oxide and sulfur ligands:

- structure, (photo)reactivity and biological importance // *Coord. Chem. Rev.* 2005. V. 249. P. 2408–2436.
3. *Mocellin S., Bronte V., Nitti D.* Nitric Oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities // *Medicinal Reserch Reviews.* 2007. V. 27. № 3. P. 317–352.
 4. *Алдошин С.М., Санина Н.А.* Функциональные нитрозильные комплексы железа – новый класс доноров монооксида азота для лечения социально значимых заболеваний // *Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии.* Т. 1 / Под ред. А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова. М.: МАКС-Пресс, 2015.
 5. *Enemark J.H., Feltham R.D.* Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl complexes // *Coord. Chem. Rev.* 1974. V. 13. № 4. P. 339–406.
 6. *Aldoshin S.M., Lysenko K.A., Antipin M. Yu. et al.* Precision X-ray study of mononuclear dinitrosyl iron complex $[\text{Fe}(\text{SC}_2\text{H}_3\text{N}_3)(\text{SC}_2\text{H}_2\text{N}_3)(\text{NO})_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ at low temperatures // *J. Mol. Structure.* 2008. V. 875. P. 309–315.
 7. *Shestakov A.F., Shul'ga Yu.M., Emel'yanova N.S. et al.* Experimental and theoretical study of the arrangement, electronic structure and properties of neutral paramagnetic binuclear nitrosyl iron complexes with azaheterocyclic thioyls having “S–C–N type” coordination of bridging ligands // *Inorg. Chim. Acta.* 2009. V. 362. P. 2499–2504.
 8. *Emel'yanova N., Shmatko N., Sanina N., Aldoshin S.* Quantum-chemical study of the $\text{Fe}(\text{NO})_2$ fragment in the cation of mononuclear nitrosyl iron complex $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ // *Comput. Theor. Chem.* 2015. V. 1060. P. 1–9.
 9. *Санина Н.А., Алдошин С.М.* Синтез, строение и свойства моделей нитрозильных $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, $[1\text{Fe}-2\text{S}]$ протеинов и перспективы применения их в биологии и медицине // *Российский химический журнал.* 2004. № 4. С. 12–19.
 10. *Емельянова Н.С., Шматко Н.Ю., Санина Н.А. и др.* Экспериментальное и квантово-химическое моделирование влияния рН среды на NO-донорную активность моноядерного нитрозильного комплекса железа $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ // *Известия АН. Серия химическая.* 2015. № 10. С. 2344–2350.
 11. *Емельянова Н.С., Санина Н.А., Князькина Е.В. и др.* Квантово-химическое моделирование влияния природы лиганда “m-SCN”-типа на редокс-свойства нитрозильных комплексов железа // *Известия АН. Серия химическая.* 2014. № 6. С. 1265–1269.
 12. *Санина Н.А., Серебрякова Л.И., Шульженко В.С. и др.* Применение биядерного сера-нитрозильного комплекса железа анионного типа в качестве вазодилаторного лекарственного средства. Патент РФ № 2437667 (2011).
 13. *Санина Н.А., Серебрякова Л.И., Шульженко В.С. и др.* Применение биядерного сера-нитрозильного комплекса железа катионного типа в качестве вазодилаторного лекарственного средства. Патент РФ № 2460531 (2012).
 14. *Гостеев А.Ю., Зорин А.В., Роденков О.В. и др.* Гемодинамические эффекты синтетического аналога эндогенных донаторов оксида азота (II) – препарата динитрозильных комплексов железа у больных артериальной гипертонией с неосложненными гипертоническими кризами // *Терапевтический архив.* 2014. № 9. С. 49–55.
 15. *Васильева С.В., Мошкова Е.Ю., Санина Н.А. и др.* Трансдукция генетического сигнала нитрозильными комплексами железа // *Биохимия.* 2004. № 8. С. 1088–1095.
 16. *Vasilieva S.V., Moschkovskaya E.Ju., Terekhov A.S. et al.* Intracellular iron ions regulate the genetic activity of NO-donating agents // *Russian Journal of Genetics.* 2006. № 7. P. 737–743.
 17. *Жукова О.С., Санина Н.А., Фетисова Л.В., Герасимова Г.К.* Цитотоксический эффект нитрозильных комплексов железа на опухолевые клетки человека *in vitro* // *Российский биотерапевтический журнал.* 2006. № 1. С. 14–20.
 18. *Санина Н.А., Жукова О.С., Алдошин С.М. и др.* Применение тетранитрозильного комплекса железа с тиофенолом в качестве противоопухолевого лекарственного средства. Патент РФ № 2429242 (2011).
 19. *Санина Н.А., Жукова О.С., Смирнова З.С. и др.* Биядерные нитрозильные комплексы железа с бензагетероциклическими производными, способ их получения. Патент РФ № 2441872 (2012).
 20. *Санина Н.А., Лысенко К.А., Жукова О.С. и др.* Водорастворимые биядерные катионные нитрозильные комплексы железа с природными алифатическими тиолилами, обладающие цитотоксической, апоптотической и по-донорной активностью. Патент РФ № 2441873 (2012).

ВЕКТОРНЫЕ НАНОСИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В КЛЕТКИ-МИШЕНИ

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН В.П. ЧЕХОНИНА^а, АКАДЕМИКА РАН А.А. ПОТАПОВА^б,
АКАДЕМИКА РАН А.Н. КОНОВАЛОВА^б

^а Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

^б Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва, Россия

e-mail: chekhoninnew@yandex.ru, apotapov@nsi.ru, akonovvalov@nsi.ru

Поступил в редакцию 11.01.2016 г.

Традиционные подходы химиотерапии остаются малоэффективными в случае агрессивных опухолей центральной нервной системы. В связи с этим активно изучаются новые стратегии направленной доставки противоопухолевых препаратов. В работе приводятся результаты исследования векторных наноконтейнерных систем на основе анти-Cx43 и анти-GFAP моноклональных антител для терапии экспериментальной глиомы С6. Особое внимание уделено созданию модели глиомы С6 у крыс, синтезу препаратов векторных иммунолипосом и изучению связывания клеток глиомы С6 с моноклональными анти-Cx43 и анти-GFAP антителами в условиях *in vivo* после внутривенного введения. В результате исследования методом иммунофлуоресценции и прижизненной МРТ продемонстрирована возможность визуализации периглиомного пространства с помощью полученных наноконтейнерных систем, что позволяет использовать подобные системы для направленной доставки диагностических и терапевтических агентов в периглиомную зону высокозлокачественных глиом.

Ключевые слова: иммунолипосомы, наноконтейнеры, моноклональные антитела, направленный транспорт, Cx43, GFAP, глиобластома, экспериментальная глиома С6.

DOI: 10.7868/S0869587316060098

Направленный транспорт противоопухолевых препаратов и генетического материала в клетки-мишени является одной из ключевых проблем в химиотерапии злокачественных образований, в том числе глиом высокой степени злокачественности. Перспективным в плане её решения представляется использование векторных наночастиц и наноконтейнеров, составляющее суть нанобиотехнологического подхода [1]. Сегодня наиболее хорошо изучены и начинают активно применяться в клинической практике наноконтейнеры для векторной доставки лекарственных препаратов и генетического материала – липосомы [2]. Их преимущество заключается в том, что они имеют большую вместимость как для гидрофильных, так

и для гидрофобных лекарственных препаратов. Технология модификации липосом полиэтиленгликолем (ПЭГ) или другими инертными полимерами пролонгирует их фармакокинетику, делая их невидимыми для ретикулоэндотелиальной системы.

Дефект гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) приводит к хорошо известному феномену повышения его проницаемости, благодаря чему наноконтейнеры направленно проникают в межклеточное пространство. Однако их направленный активный транспорт в опухолевые клетки невозможен без опухоль-специфического вектора. Применение гетеробифункционального ПЭГ (например, DSPE-PEG с малеимидной группой) даёт возможность ковалентно конъюгировать эти молекулы с липосомами.

Клетки низкоккачественных глиом характеризуются спектром белков, ассоциированных с мутациями генов *IDH*, *1p/19q* и *TP53*, которые могут быть целями при направленной терапии [3]. В высокозлокачественных глиомах основными целями для высокоселективной клеточной те-

ЧЕХОНИН Владимир Павлович – академик РАН, руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава России. ПОТАПОВ Александр Александрович – академик, директор НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. КОНОВАЛОВ Александр Николаевич – академик, научный руководитель НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко.

рапии являются клетки, расположенные в перипухоловой зоне. Эта область характеризуется высоким уровнем перивазальной и периаксональной инвазии глиомных клеток в нормальную нервную ткань. Перитуморальная зона окружена со стороны нормальной нервной ткани значительным пограничным слоем реактивных астроцитов, визуализирующихся при помощи антител к основному астроглиальному маркеру – глиофибрилярному антигену (GFAP). Моноклональные антитела к этому антигену могут аккумулироваться в перипухоловой зоне, где большое количество астроцитов разрушено, благодаря чему GFAP становится доступным для антител [4].

И реактивные астроциты, и быстро мигрирующие глиобластомные клетки экспонируют на своей мембране коннексин 43 (Cx43) – интегральный мембранный белок, формирующий коннексоны [5]. Коннексоны представляют собой структуры, образующие щелевые контакты, которые обеспечивают клеточное взаимодействие и межклеточный обмен внутриклеточными мессенджерами [6]. Гетерологичные щелевые контакты между клетками глиомы и GFAP-позитивными астроцитами могут играть ключевую роль в активной миграции Cx43-позитивных глиомных клеток в перитуморальную зону [5, 7]. Cx43-позитивные клетки имеют не только более высокий миграционный потенциал по сравнению с Cx43-негативными клетками, но они и более резистентны к оксидативному стрессу и другим неблагоприятным факторам [8, 9].

Всё вышесказанное позволяет сделать вывод, что и GFAP, и Cx43-позитивные клетки являются многообещающими целями для разработки принципиально новых средств, подавляющих инвазию глиобластомных клеток при высокоселективной доставке лекарственных препаратов. Ранее нами были получены моноклональные антитела к GFAP [10] и антитела к рекомбинантному E2 экстраклеточному фрагменту Cx43 [11], взаимодействующие с Cx43 в нативной конформации. Эти антитела использовались для разработки липосомальных систем направленного транспорта в клетки-мишени в экспериментах *in vitro* [12, 13]. На следующем этапе основной целью было оценить в экспериментах *in vivo* эффективность транспорта ПЭГилированных иммунолипосом в перипухоловую зону экспериментальной глиомы на основе двух высокоспецифичных векторов – анти-GFAP и анти-MAbE2Cx43 антител.

Методология исследования. На первом этапе путём интрацеребральной стереотаксической имплантации клеток глиомы C6 35 взрослым самкам крыс линии Wistar весом 200–220 г было выполнено моделирование глиомы. Клетки глиомы (5×10^5 клеток в расчёте на 1 крысу) имплантировались в стриатум крыс с помощью стереотаксиче-

ского оборудования “Narishige” по координатам Ap –1, L 3.0, V 4.5, TBS –2.4 мм в соответствии с атласом мозга Swanson под кетаминным наркозом (100 мг/кг). Суспензия клеток (5–7 μ l) вводилась со скоростью 3 μ l/мин с помощью гамилтоновского шприца, соединённого с микроинжектором.

Синтез ПЭГилированных липосом. Stealth-липосомы, конъюгированные с вектором, были получены по методу, предложенному в работе [14]. Лецитин, холестерол и дистеароилфосфатидил-этанолламин (DSPE), конъюгированный с 2000-Да ПЭГ (PEG-2000), были использованы как основные компоненты ПЭГилированных липосом. В с-компонентную композицию липосом с целью обеспечения конъюгации с антителами включали малеимидное производное DSPE–PEG-2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol) 2000]). В этой молекуле малеимидная группа связана с наружным концом цепи ПЭГ-2000, она позволяет конъюгировать с ней векторный белок снаружи защищающего слоя ПЭГ. Следующий компонент – 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI), был введён в структуру как флуоресцентная метка. Подробный протокол получения липосом опубликован в [15]. Моноклональные анти-GFAP или анти-E2Cx43 антитела были конъюгированы с синтезированными согласно этому протоколу ПЭГилированными липосомами после предварительной модификации их 2-иминотиолоном, который реагирует со свободными первичными аминогруппами белка (например, с ϵ -аминогруппами лизина). Эффективность такой ковалентной конъюгации ПЭГилированных липосом с антителами достигала 80%.

Внутривенное введение флуоресцентно-меченых антител к E2 экстраклеточной петле Cx43, конъюгированных с Alexa Fluor 660 (Invitrogen), осуществлялось в бедренную вену 8 крыс с 18-дневной экспериментальной глиомой в дозе 100 мг/кг веса животного. В контрольной группе, состоящей также из 8 крыс, вводились в таких же дозах неспецифические иммуноглобулины мыши, идентичным образом конъюгированные с Alexa Fluor (Invitrogen).

Для внутривенного введения липосом 32 крысы с экспериментальной глиомой были случайным образом разделены на две группы по 16 животных в каждой. Крысам первой группы вводили препарат флуоресцентно-меченых липосом, конъюгированных с анти-GFAP антителами (4 животных), анти-Cx43 антителами (4 животных), неспецифическими иммуноглобулинами мыши (4 животных), а также препарат флуоресцентно-меченых липосом без векторных антител (4 животных). Крысам второй группы вводили препарат парамагнитных липосом, конъюгированных с анти-GFAP антителами (4 животных), анти-Cx43

Физико-химические характеристики ПЭГилированных иммунолипосом с неспецифическими (IgG) и специфическими (анти-Cx43 и анти-GFAP) антителами

Параметр	Dil-липосомы/IgG	Gd-DTPA-липосомы/IgG	Dil-липосомы/моноклональные антитела	Gd-DTPA-липосомы/моноклональные антитела
Общая концентрация (мг/мл)	20.0 ± 1.2	18.8 ± 0.9	20.5 ± 1.1	18.0 ± 0.9
Концентрация антител (мг/мл)	0.43 ± 0.01	0.60 ± 0.02	0.48 ± 0.01	0.54 ± 0.01
Размер (нм)*	130.1 ± 5.6	138.3 ± 11.5	130.5 ± 6.2	140.5 ± 11.1
Индекс полидисперсности (PDI)	0.150 ± 0.01	0.168 ± 0.01	0.150 ± 0.01	0.150 ± 0.01
Zeta-потенциал (mV)	-5.0 ± 0.1	-5.3 ± 0.1	-5.1 ± 0.1	-5.3 ± 0.1

* Результаты представлены как среднее ± SEM в более чем 4 экспериментах.

антителами (4 животных), неспецифическими иммуноглобулинами мыши (4 животных), а также парамагнитных липосом без векторных антител (4 животных). В дополнение к указанным группам в качестве позитивного контроля была сформирована группа крыс (5 животных), которым вводился препарат Gd-DTPA, усиливающий визуализацию глиомы.

Визуализация проводилась с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) мозга крыс – томограф BioSpec 70/30 (Bruker) 7 T. Для получения МР-изображений применялся линейный трансмиттер с внутренним диаметром 72 мм и принимающей четырёхканальной квадратной катушкой для детекции радиочастотного сигнала, соответствующий протокол представлен в [15]. Помимо МРТ для визуализации иммунолипосомальных контейнеров применялась сканирующая лазерная конфокальная микроскопия. В качестве маркеров иммунолипосомальных наноконтейнеров использовались: для иммунофлуоресценции – высокостабильный в биологических системах липофильный флуорофор Dil C18 и Gd-DTPA, для МРТ – хорошо известный T1 контрастный агент. Принимая во внимание кинетику stealth-липосом (наши собственные и данные других исследователей показывают, что T_{1/2} ПЭГилированных липосом, введённых внутривенно крысам, не короче 15 ч), процедура МРТ выполнялась через 6 и 24 ч после введения.

Результаты исследования. На первой стадии проводимых исследований было необходимо убедиться в том, что моноклональные анти-Cx43 антитела, связывающиеся с клетками глиомы C6 *in vitro*, также способны захватываться клетками экспериментальной глиомы C6 после внутривенного введения [16]. Для этого моноклональные анти-Cx43 антитела, меченные Alexa Fluor 660, были внутривенно введены крысам с моделированной интракраниальной глиомой C6. Анализ флуоресценции срезов ткани мозга показал, что Cx43-позитивные клетки, захватывающие анти-

тела, были визуализированы на периферии глиомы спустя 48 ч после инъекции. Примечательно, что после инъекции неспецифических иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с Alexa Fluor 660, клетки на периферии глиомы не визуализировались.

Благодаря дополнительной иммунофлуоресцентной визуализации астроцитов моноклональными анти-GFAP антителами и последующей колокализации было обнаружено, что введённые внутривенно анти-Cx43 антитела в основном аккумулируются в перипухоловом астроглиальном пространстве, где клетки глиомы контактируют с реактивными астроцитами. Более того, как выяснилось при анализе “слитого изображения”, введённые внутривенно моноклональные антитела захватывались и GFAP-позитивными астроцитами, и GFAP-негативными клетками. Последние можно классифицировать и в качестве низкокодифференцированных астробластов, и в качестве Cx43-позитивных глиомных клеток, которые также не экспрессируют GFAP.

С целью изучения природы низкокодифференцированных клеток в астроглиальном вале использовались иммунофлуоресцентная визуализация нестин-позитивных и GFAP-позитивных клеток. Было выявлено, что клетки глиомы также, как некоторые реактивные клетки астроглиального вала, были нестин-позитивными. Некоторые астроглиальные клетки одновременно экспрессировали оба белка промежуточных филаментов GFAP и нестин. Следует отметить, что визуализация нестина на клетках не позволила обнаружить различия между Cx43-позитивными клетками, происходящими и из астроглиального вала, и из самой опухоли, поскольку и астробласты, и глиомные клетки могут быть как GFAP-негативными, так и нестин-позитивными.

Для характеристики ПЭГилированных липосом использовались полученные посредством динамического светового рассеяния значения таких параметров, как диаметр, дзета-потенциал, ин-

декс полидисперсности, а также определялась общая концентрация липидов и белков в образцах иммунолипосом (табл.). Важно учитывать, что DiI-иммунолипосомы и Gd-DTPA-иммунолипосомы, конъюгированные со специфическими и неспецифическими векторами, по существу, не отличались.

Флуоресцентный анализ мозга спустя 48 ч после внутривенного введения иммунолипосом, конъюгированных с анти-GFAP и анти-Cx43 антителами, крысам с экспериментальной глиомой показал, что оба типа иммунолипосом захватывались и аккумулировались в клетках перитуморального астроглиального вала. Специфическая DiI-флуоресценция была выявлена в виде внутриклеточных включений в случае липосом с анти-GFAP-антительным вектором и в виде гетерогенного окрашивания цитоплазмы в случае использования липосом с анти-Cx43-антительным вектором. Инъекции не векторных липосом, а также липосом, конъюгированных с неспецифическим вектором (неспецифические иммуноглобулины мыши), не приводили к визуализации клеток перитуморального астроглиального вала.

В течение первых 30 мин после внутривенной инъекции Gd-DTPA контрастный агент быстро аккумулировался в глиоме, а затем элиминировался в течение 1 ч. Наиболее интенсивная аккумуляция наблюдалась в центральных областях опухоли за исключением не васкуляризованных некротических зон. Контрастный агент позволял лишь незначительно усилить изображение периферической зоны опухоли, содержащей астроглиальный вал и наиболее активные области инвазии.

Применение не векторных липосом или липосом с неспецифическим вектором не приводило к аккумуляции сигнала в поражённом полушарии. Инъекция stealth-липосом, конъюгированных с анти-GFAP-антительным вектором, приводила к незначительному усилению сигнала в перипухолевой зоне в одном из трёх случаев, однако статистически значимого накопления контрастного агента обнаружить не удалось, вероятно, потому, что захват иммунолипосом реактивными астроцитами был недостаточен для обнаружения с помощью магнитно-резонансной томографии.

Инъекция stealth-липосом, конъюгированных с анти-Cx43-антительным вектором, значительно повышала интенсивность T1 сигнала по периферии опухоли в течение 6 ч, поэтому гипоинтенсивная опухолевая ткань становилась в этих условиях изоинтенсивной. Вычитание из усиленного T1-взвешенного изображения пиксельных значений до инъекции контрастных агентов позволило визуализировать накопление конъюгированных с анти-Cx43 антителами иммунолипосом в зоне перипухолевой глиомной инвазии.

Результаты, полученные после внутривенного введения меченых анти-Cx43 антител, так же, как и более ранние результаты по накоплению

анти-GFAP антител в перитуморальной зоне [4], позволили сделать предположение о том, что эти два типа антител могут быть использованы для направленной доставки диагностических и лекарственных препаратов в перитуморальную зону инвазии высококачественных глиом.

Возможно, анти-Cx43 антитела преимущественно более активно связываются астроцитами и глиобластами, чем реактивными астроцитами, потому что большинство коннексонов в дифференцированных астроцитах находится в форме димеризованных щелевых контактов, которые не узнаются антителами к внеклеточной петле Cx43.

Полученные при визуализации GFAP результаты были до некоторой степени противоречивы: флуоресцентный анализ показал, что реактивные астроциты, локализованные в перитуморальной зоне, связывают конъюгированные с анти-GFAP антителами липосомы. В то же время МРТ не позволила получить надёжных данных, свидетельствующих о накоплении парамагнитного контрастного агента в клетках-мишенях. Эти обстоятельства могут быть следствием относительно низкой чувствительности МРТ по сравнению с иммунофлуоресцентным анализом. Параметры, отражающие накопление GFAP в реактивных астроцитах, возможно, зависят от функционального состояния клеток и других параметров и не всегда могут быть детектируемы методами МРТ.

Хорошо известно, что GFAP является внутриклеточным белком промежуточных филаментов, поэтому большой интерес представляет механизм, благодаря которому липосомы, конъюгированные с анти-GFAP антителами, проникают внутрь клеток. Весьма перспективной представляется гипотеза о существовании неидентифицированных путей интернализации водорастворимых форм GFAP, однако её проверка требует серии специальных экспериментов.

В противоположность цитоплазматическому GFAP экстраклеточный домен интегрального белка коннексонов локализован на внешней клеточной мембране (E2 экстраклеточная петля). Эффективность взаимодействия иммунонаноконтейнерных систем, созданных на основе анти-Cx43 антител, определяется только уровнем экспрессии Cx43. Интенсивность биосинтеза этого белка достаточно высока в реактивных астроцитах, а также в глиомных клетках, в больших количествах мигрирующих на периферию опухоли, что позволяет детектировать накопление иммунолипосомальных контейнеров в этой зоне как с помощью иммунофлуоресцентного анализа, так и с помощью МРТ.

Кроме реактивных астроцитов кардиомиоциты также экспрессируют значительные количества Cx43. Однако, поскольку антитела, использованные в нашем исследовании, комплементарны только молекуле Cx43, формирующей гемиканалы коннексонов, внутривенное введение этих антител или иммунонаноконтейнеров на их основе не

приводило к их накоплению в сердце, где все коннексоны являются компонентами щелевых контактов и экстраклеточные домены экранированы от антител.

Парамагнитный контрастирующий агент, созданный на основе иммунолипосом с Cx43-антительным вектором, избирательно накапливался в перитуморальной зоне, где процессы инвазии глиомных клеток отличаются наибольшей интенсивностью. Это является основным преимуществом разработанной системы перед стандартным контрастирующим агентом Gd-DTPA, преимущественно накапливающимся в опухолевом ядре.

Направленная высокоселективная доставка в перитуморальную зону с помощью анти-GFAP и анти-Cx43 антител имеет очевидные области практического применения. Во-первых, с её помощью можно корректно объективизировать границы опухоли, включая все области перивазальной и периаksonальной инвазии, что особенно важно, например, в случаях хирургического удаления опухолей. Так как реактивные астроциты и астробласты присутствуют во всех подобных областях [1], их адекватная визуализация позволит прецизионно разграничить зону глиомной инвазии и нормальную нервную ткань. Во-вторых, как продемонстрировали недавние исследования, опухолевые стволовые клетки, поддерживающие пул быстро мигрирующих радио- и химиорезистентных глиомных клеток, локализируются исключительно в периглиомной зоне [17]. Так, направленная высокоселективная доставка наноконтейнерных систем с противоопухолевыми агентами в эту зону может предотвратить инвазивный рост глиом высокой степени злокачественности.

Опираясь на результаты экспериментальных исследований, можно сделать вывод о том, что полученные моноклональные анти-GFAP и анти-Cx43 антитела могут высокоспецифично захватываться клетками периглиомной зоны (GFAP-позитивными реактивными астроцитами и Cx43-позитивными глиомными клетками). Иммунофлуоресцентный анализ и прижизненная МРТ продемонстрировали, что наноконтейнерные системы, базирующиеся на этих антителах, позволяют надёжно визуализировать периглиомное пространство вокруг глиомы С6. Эти наноконтейнерные системы могут быть также использованы для направленной доставки диагностических и терапевтических агентов, а также генетического материала в периглиомную зону высокозлокачественных глиом, где процессы инвазии глиомных клеток наиболее интенсивны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alam M.I., Beg S., Samad A. et al. Strategy for effective brain drug delivery // *J. Pharm. Sci.* 2010. V. 40. P. 385–403.
2. Brasnjevic I., Steinbusch H.W., Schmitz C., Martinez-Martinez P. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier // *Prog. Neurobiol.* 2009. V. 87. P. 212–251.
3. Brat D.J., Verhaak R.G.V., Aldape K.D. et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas // *New Engl. J. Med.* 2015. V. 372. P. 2481–2498.
4. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M. et al. Targeted transport of (125)I-labeled antibody to GFAP and AMVB1 in an experimental rat model of C6 glioma // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009. V. 4. P. 28–34.
5. Oliveira R., Christov C., Guillamo J.S. et al. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas // *BMC Cell Biology.* 2005. V. 6. P. 7.
6. Prochnow N., Dermietzel R. Connexons and cell adhesion: a romantic phase // *Histochem. Cell Biol.* 2008. V. 130. P. 71–77.
7. Bates D.C., Sin W.C., Aftab Q., Naus C.C. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus // *Glia.* 2007. V. 55. P. 1554–1564.
8. Lin J.H., Takano T., Cotrina M.L. et al. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 4302–4311.
9. Giardina S.F., Mikami M., Goubaeva F., Yang J. Connexin 43 confers resistance to hydrogen peroxide-mediated apoptosis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 362. P. 747–752.
10. Chekhonin V.P., Gurina O.I., Dmitrieva T.B. et al. Monoclonal anti-GFAP antibodies: extraction, characteristics, and immunoenzyme assay // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2001. V. 132. P. 772–775.
11. Baklaushev V.P., Gurina O.I., Yusubaliev G.M. et al. Immunofluorescent analysis of connexin-43 using monoclonal antibodies to its extracellular domain // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. V. 148. P. 725–730.
12. Chekhonin V.P., Zhirkov Y.A., Gurina O.I. et al. PEGylated immunoliposomes directed against brain astrocytes // *Drug Deliv.* 2005. V. 12. P. 1–6.
13. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Gurina O.I. et al. A binary immunoliposomal system directed to Cx43-positive glioma cells // *Drug Delivery Tech.* 2010. V. 10. P. 42–47.
14. Kamps J.A., Koning G.A., Velinova M.J. et al. Uptake of long-circulating immunoliposomes, directed against colon adenocarcinoma cells, by liver metastases of colon cancer // *J. Drug Target.* 2000. V. 8. P. 235–245.
15. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M. et al. Targeted delivery of liposomal nanocontainers to the peritumoral zone of glioma by means of monoclonal antibodies against GFAP and the extracellular loop of Cx43 // *Nanomedicine.* 2012. V. 8. P. 63–70.
16. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M. et al. Modeling and immunohistochemical analysis of C6 glioma in vivo // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. V. 143. P. 501–509.
17. Dietrich J., Diamond E.L., Kesari S. Glioma stem cell signaling: therapeutic opportunities and challenges // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2010. V. 10. P. 709–722.
18. Koshkin P.A., Chistiakov D.A., Nikitin A.G. et al. Analysis of expression of microRNAs and genes involved in the control of key signaling mechanisms that support or inhibit development of brain tumors of different grades // *Clin. Chim. Acta.* 2014. V. 430. P. 55–62.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА И РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ – ЛЕКАРСТВА ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

© 2016 г. ДОКЛАД ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН А.Г. ГАБИБОВА

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

e-mail: gabibov@gmail.com

Поступил в редакцию 18.01.2016 г.

Одним из интенсивно развивающихся направлений современной биотехнологии является получение рекомбинантных антител и белков. Рекомбинантные антитела обладают иммуногенными свойствами, способны на протяжении длительного времени сохраняться в крови и нейтрализовывать патогены, токсины, вирусы, а также уничтожать опухолевые клетки. Рекомбинантные белки широко применяются для лечения и профилактики заболеваний, а также с целью диагностики. Актуальное направление современной медицинской биотехнологии – создание лекарств пролонгированного действия на основе белков, полученных методами генетической инженерии. Также ждёт решения вопрос улучшения специфичности и избирательности препаратов на основе ферментов и антител. Всё это возможно осуществить с помощью подходов современной комбинаторной химии и биологии и квантово-механических расчётов.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, рекомбинантные белки, иммунобиотехнология, генная инженерия, *Escherichia coli*, клеточная линия СНО, комбинаторная химия и биология, антидоты, квантово-механические расчёты активных центров биокатализаторов.

DOI: 10.7868/S0869587316060104

В 1908 г. Нобелевская премия по физиологии и медицине была присуждена за работу по теории иммунитета двум великим учёным – немецкому исследователю П. Эрлиху и нашему соотечественнику И.И. Мечникову. Их открытия перевернули представление об иммунологии и фундаментальной медицине тех лет. По прошествии века стало очевидно, что работы Эрлиха и Мечникова имеют огромное значение для современной молекулярной фармакологии и практической медицины. Труды Мечникова в известной степени явились предтечей награждения Нобелевской премией 2011 г. Б. Бойтлера, Р. Стейнмена и Ж. Хоффмана за открытие системы врождённого иммунитета. Без сомнения, в ближайшем будущем эта система станет точкой приложения современной фармакологии. Концепцию же П. Эрлиха о “волшебной пуле” уже сегодня можно рассматривать в качестве руководства к действию при создании таргетных фармпрепаратов, полученных на основе технологии рекомбинантных ДНК. Эрлих полагал, что если будет создано соединение, способное селективно действовать на патологическую область организма, то токсин для её уничтожения может быть доставлен с помощью агента селек-

тивности. Идеальный терапевтический агент – “волшебная пуля” – будет убивать патологическую область направленно.

Манипуляции с рекомбинантными молекулами позволяют обеспечить оптимальные структуры различных носителей лекарства, осуществляющих его доставку к физиологической мишени с помощью “самонаводящегося устройства”. Наиболее успешно реализуемые попытки создания лекарств на основе концепции “волшебной пули” относятся к области рекомбинантных антител [1, 2]. Различные структуры, полученные на основе генно-инженерных фрагментов иммуноглобулинов, позволяют осуществить направленную доставку, например, небольшого количества токсичных соединений в концентрациях, оптимальных для уничтожения раковой клетки [2]. Преимущества подхода, при котором в полном объёме реализуется концепция Эрлиха, очевидны, так как в этом случае могут быть использованы относительно малотоксичные (для организма в целом) концентрации высокотоксичного соединения. Присущее суперсемейству иммуноглобулинов свойство гипервариабельности даёт возможность получить систему специфических “самонаводящихся устройств”, направленных, например, на раковые антигены [1, 3]. Эта область исследований получила значительное развитие в мире [4].

ГАБИБОВ Александр Габирович – член-корреспондент РАН, заместитель директора по науке ИБХ РАН.

Приятно отметить, что иммунобиотехнология не забыта и в России. В нашей стране ведутся оригинальные исследования по созданию терапевтических вакцин — под руководством Р.В. Петрова и Р.М. Хаитова [5], по таргетной доставке — под руководством С.М. Деева [1, 2], по биоинженерии антител — в лабораториях М.П. Кирпичникова и Д.А. Долгих [3, 6], по созданию миниантител на основе репертуаров антител верблюда — под руководством С.В. Тиллиба и А.Л. Гинцбурга [7], по созданию специфических репертуаров антител к нейроантигенам — под руководством В.П. Чехонина [8], по детальному исследованию системы фактора некроза опухолей (ФНО) при аутоиммунных патологиях и развитию антительной терапии при гиперэкспрессии ФНО — в коллективе С.А. Недоспасова [9].

Задачи улучшения фармакокинетических параметров рекомбинантных белковых препаратов. Современная медицина использует широкий спектр лекарственных средств нового поколения, основанных на технологии рекомбинантных ДНК. Генно-инженерные белки, цитокины, антитела, гормоны стали незаменимыми препаратами при лечении онкологических, нейродегенеративных, аутоиммунных, эндокринных заболеваний. Являясь зачастую полными аналогами белков, закодированных в геноме человека, они тем не менее уступают им по параметрам биодegradации. Это во многом обусловлено способом их экспрессии в прокариотических системах, не дающих возможности проведения посттрансляционного гликозилирования. Разработка подходов к созданию нового поколения терапевтических средств пролонгированного действия на основе рекомбинантных белков является важнейшей задачей современной медицинской биотехнологии и фармации. Препараты на основе рекомбинантных пептидов и белков при соблюдении всех этапов биотехнологического процесса не уступают своим природным аналогам и специфически воздействуют на рецепторный аппарат клеток, осуществляя корректирующие действие при нарушении ряда физиологических процессов в организме человека. Практическое решение вопроса высоких уровней экспрессии генетических копий в гетерологических системах (прокариотических клетках, дрожжах, клетках млекопитающих) позволило превратить производство генно-инженерных терапевтических белков в бурно развивающуюся современную область биофармацевтики с уровнем продаж в миллиарды долларов (в 2014 г. 3.2 млрд. долл.); в следующие пять лет ожидаются опережающие темпы роста российского рынка биофармацевтики, к 2019 г. объём продаж увеличится на 80% и составит 5.1 млрд. долл., что эквивалентно 2% мирового рынка).

Среди рекомбинантных белковых препаратов особое место принадлежит антителам, представи-

телям суперсемейства иммуноглобулинов (Igs), обладающим уникальным свойством гипервариабельности структуры в определённых регионах (complementarity determining regions). Свойство гипервариабельности позволяет получать рекомбинантные антитела на широкий спектр антигенов, например маркёров развития опухолевой трансформации, и, следовательно, получать на их основе уникальные средства направленной доставки терапевтических молекул к опухоли [1]. Показано, что антитела могут не только связывать различные молекулы, играя роль специфических ингибиторов многих патологических процессов, но и разрушать антигены, открывая широкие перспективы для разработки эффективных фармакологически активных молекул [10–13].

Внедрение в медицинскую практику рекомбинантных белковых препаратов ставит вопрос об оптимальном времени жизни этих молекул в организме человека с целью получения максимального терапевтического эффекта. Большинство рекомбинантных терапевтических белков относительно быстро деградирует в организме и в этой связи нуждается в разработке методов улучшения их фармакокинетических параметров. Это во многом достигается путём химической модификации молекулы рекомбинантного белка. Антитела обладают уникальным свойством — стабильностью в кровотоке, и в этой связи создание фармпрепаратов на их основе имеет ряд преимуществ. В случае рекомбинантных антител весьма остро встаёт вопрос улучшения их свойств связывания или деградации антигенов и моделирования тем самым их активных центров с помощью современных расчётных методов [14].

В настоящее время в мировой практике выделяют два наиболее актуальных научных направления совершенствования технологий рекомбинантных белков. Первое направление касается получения лекарственных форм препаратов для введения в организм больного в форме наноконтейнеров, липосом [15]. Второе связано с увеличением периода полураспада/полувыведения белково-пептидных лекарственных средств с помощью химической модификации аминокислотной структуры белка или же с изменением фармакодинамики препарата путём присоединения к белковой молекуле полимеров определённой структуры.

К проблемам обозначенного подхода относятся: недостаточная стабильность в системах *in vitro* и *in vivo*; неустойчивость к действию протеаз; короткий период полураспада/полувыведения при введении в организм, исчисляемый минутами; иммуногенность и антигенность, характерные даже для природных белков человека; наличие выраженных побочных эффектов при длительном клиническом применении. Для решения этих проблем существует два основных метода — пэггирование и полисиалирование.

Широко применяемый сегодня подход к получению пролонгированных лекарственных средств связан с синтезом полиэтиленгликоль-модифицированных (ПЭГ-модифицированных) рекомбинантных белков. Произведённые таким способом препараты имеют улучшенные фармакокинетические параметры. Сегодня выпускается уже около 10 пэгиллированных белков, продемонстрировавших оптимальные по сравнению с немодифицированными аналогами параметры фармакокинетики. В ряде исследований, проведённых в последнее десятилетие, было предложено изменять фармакокинетику препаратов путём присоединения к белковой молекуле линейных гидрофильных полимеров определённой структуры. По этой технологии уже получены и допущены к применению гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), интерферон бета и др. [16, 17]. Имеются сообщения о положительном опыте применения пэгиллированного инсулина [18]. Тем не менее, несмотря на значительное число работ по использованию полиэтиленгликоля в качестве модифицирующего агента, указанная технология таит в себе существенные недостатки. Например, исследователи отмечают, что присоединение молекулы полиэтиленгликоля несколько ограничивает биологическую активность исходного белка или пептида [19]. Необходимо отметить, что полиэтиленгликоль, будучи синтетическим препаратом, не подвергается биодegradации, в связи с чем лекарственные средства на его основе ограниченно применимы для лечения хронических заболеваний. Применение ПЭГ-производных может сопровождаться определёнными сложностями, связанными с «нетропными» организму человека полимерами. В этой связи использование разрабатываемых препаратов на основе рекомбинантных белков, модифицированных полисиаловыми кислотами, являющихся высокоочищенными и стандартизованными продуктами деградации клеточных стенок бактерий *Escherichia coli*, имеет ряд неоспоримых преимуществ: полисиаловые кислоты, в отличие от полиэтиленгликоля, способны к биодegradации; полисиализированные препараты можно применять для лечения хронических заболеваний и высокодозовой терапии; полисиалирование лучше сохраняет биологическую активность исходного белка или пептида и значительно снижает иммуногенность белков [20–23].

Экспериментально на модельных животных была отчётливо показана пролонгация действия препарата полисиализированного инсулина с 1–2 до 12 часов при сохранении его специфической биологической активности [23]. В коллективе автора доклада эта технология была апробирована с помощью рекомбинантного гормона роста человека (препарат «Растан»), производимого на опытном производстве ИБХ РАН. Клиническая целесообразность выбора гормона роста обуслов-

лена большими потребностями этого препарата и необходимостью длительного терапевтического воздействия на детей-пациентов.

Столь же обоснованным с клинической, технологической и экономической точки зрения оказался выбор интерферона альфа-2b. Он особенно широко востребован при лечении вирусных инфекций, в том числе таких распространённых, как гепатиты В и С. Ещё более развёрнутые технологические разработки сопровождали исследования по получению препарата рекомбинантного интерферона бета-1b. Его востребованность в медицине определяется выраженным противоопухолевым эффектом, а также широким применением в неврологической практике, в частности, для лечения таких социально значимых заболеваний, как рассеянный склероз и болезнь Бехтерева.

Стратегия получения биологических антидотов пролонгированного действия к фосфорорганическим отравляющим токсинам. В конце 1930 г. в качестве инсектицидов был синтезирован ряд фосфорорганических токсинов (ФОТ). Высокая токсичность этих веществ сразу привлекла внимание военных. Хотя такие ФОТ, как табун, зарин или зоман, так и не нашли широкого применения в период Второй мировой войны, большие их количества до сих пор хранятся на военных складах многих стран [24]. Доступность ряда ФОТ в качестве пестицидов в странах с развивающейся аграрной отраслью экономики приводит к частым случаям отравлений и летальных интоксикаций. По данным Всемирной организации здравоохранения, бытовое летальное отравление ФОТ получают более 300 тыс. человек в год [24]. Несмотря на то, что в 1992 г. 185 государств присоединились к конвенции «О запрещении химического оружия», сохраняется угроза использования нервно-паралитических агентов и других ФОТ в ходе военных действий и террористических актов. Известно несколько задокументированных случаев применения ФОТ в качестве боевых отравляющих веществ (военные конфликты между Ираком и Ираном, агрессия Ирана против курдов, террористические акты в японских городах Матсумото и Токио) [25, 26].

На протяжении последних 60 лет активно развивались методы медикаментозного лечения отравлений фосфорорганическими токсинами. Тем не менее они всё ещё несовершенны, так как позволяют избежать смерти, но не потери трудоспособности и необратимых поражений головного мозга. Альтернативным подходом в терапии и профилактике отравлений ФОТ является использование биологических антидотов [27]. Ими могут быть антитела, разнообразные функциональные циклодекстрины и ферменты, которые изолируют и инактивируют высокотоксичные соединения до того, как те достигнут своей биологической ми-

шени [28]. Из всех антитодов против ФОТ только бутирилхолинэстераза плазмы крови человека получила статус новой разработки (“New drug development”) от Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) в 2006 г. Необходимо отметить, что получение рекомбинантного белкового препарата бутирилхолинэстеразы как потенциального терапевтического препарата для предотвращения отравлений ФОТ не решена по сей день ни в России, ни за рубежом.

Предложенная нами стратегия получения рекомбинантных белковых препаратов пролонгированного действия на основе полисиалирования была успешно применена на практике [22]. Получен оригинальный высокопродуктивный клон рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека (рчБуХЭ). Очищенный препарат рчБуХЭ подвергали химическому полисиалированию.

В основе процесса лежит реакция 7-кетогруппы окисленных полимеров полисиаловой кислоты с N-концевой аминогруппой фермента и/или ε-аминогруппой остатка лизина. В результате этого взаимодействия образуются основания Шиффа, которые далее восстанавливаются NaBH_3CN . Проведение химического полисиалирования в неоптимальных условиях может не только снизить выход реакции, но и существенно уменьшить удельную активность фермента. В результате проведённых экспериментов стало возможно определить условия, при которых удалось добиться не менее 80% выхода реакции при относительно невысокой (не более 10%) потере удельной активности фермента. Получен активный клон рчБуХЭ-CAO27, продукция которого из литры среды доходила до 30 мг. Для определения эффекта полисиалирования на фармакокинетические параметры рчБуХЭ-CAO27 были проведены испытания на животных. В результате химического полисиалирования время полувыведения рчБуХЭ-CAO27 увеличилось в 6 раз по сравнению с немодифицированным рекомбинантным ферментом и стало сопоставимо с временем полувыведения БуХЭ, полученной из плазмы крови человека. Для определения защитной эффективности конъюгата рчБуХЭ-CAO27 на первом этапе эксперимента были определены бимолекулярные константы ингибирования модифицированного и немодифицированного фермента агентом ФОТ VR. Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о способности чБуХЭ и рчБуХЭ эффективно связывать агент VR и, во-вторых, о том, что химическое полисиалирование не влияет на способность рчБуХЭ связывать данный ФОТ. Способность рчБуХЭ эффективно связывать агент VR стало основанием для проведения эксперимента на животных. В результате удалось рассчитать величины защитных индексов двух препаратов: для дозы 21 мг/кг рчБуХЭ-CAO27 и чБуХЭ

величина защитного индекса составила 4.2 и 4.7 соответственно, что сопоставимо с БуХЭ плазмы крови человека [22].

Для контроля скрытых побочных эффектов препаратов рчБуХЭ-CAO27 и чБуХЭ на протяжении всего эксперимента животные наблюдались в серии тестов “Открытое поле” и проходили испытание на физическую выносливость на тредбане (тренажёре для бега и ходьбы). В течение первых трёх часов после отравления агентом VR наблюдался значительный спад в активности животных, вероятно, вследствие переживаемого стресса, однако спустя сутки все животные восстанавливали свои поведенческие показатели.

Таким образом было доказано, что препарат рекомбинантной БуХЭ плазмы крови человека, модифицированный полимерами N-ацетилнейраминовой кислоты, при внутривенном введении в дозировке 21 мг/кг живого веса обеспечивает профилактическую защиту от действия 4.2 ЛД₅₀ агента VR, не вызывая последствий. Полученный конъюгат рчБуХЭ-CAO27 полностью удовлетворяет основным требованиям к биологическому антитоду. Предложенный подход, основанный на химическом полисиалировании, может обеспечить получение других фармакологически важных рекомбинантных белковых препаратов.

Применение методов комбинаторной химии и биологии для получения эффективных терапевтических антител. Современные подходы в области инженерии антител позволяют получать высокоэффективные терапевтические препараты с заранее заданными свойствами [1]. Предложенный коллективом ИБХ РАН под руководством автора доклада подход, основанный на новых скрининговых технологиях с использованием на последующих этапах расчётных методов, позволит вплотную подойти к разработке терапевтических антитодов к ФОТ с высокими защитными параметрами. В научном сообществе активно обсуждается возможность использования антител в качестве гидролизующих ФОТ энзимов. Утверждается, что антитела не могут обеспечить правильного расположения аминокислотных остатков, необходимых для катализа, а также не обладают достаточной подвижностью для реализации катализа. Однако в работе [27] доказана возможность комбинирования иммунизации аналогом переходного состояния реакции с отбором на ковалентный катализ для получения эффективных каталитических антител – абзимов.

Отбор клонов-биокатализаторов по способности к ковалентному взаимодействию имеет ряд преимуществ и позволяет применять жёсткие условия к селекции. Более того, условия реакции и выбор реагента можно изменять с целью достижения кинетической или термодинамической селективности. Существует большое число ингибиторов сериновых гидролаз, образующих стабиль-

ные ковалентные комплексы по типу ацил-фермент. Одним из хорошо изученных необратимых ингибиторов сериновых гидролаз является диизопропилфторфосфат (ДФФ). Пептидилфосфонаты и фторфосфонаты являются производными ДФФ и интенсивно изучаются. Образую ковалентную связь ингибитор-фермент, фосфонаты имитируют стабильное переходное состояние реакции. Такой подход был предложен нами впервые и привёл к селекции из полусинтетической библиотеки генов иммуноглобулинов нескольких потенциально интересных каталитически активных клонов [28].

Получено полноразмерное антитело с переменными фрагментами – А17. ДНК-клон был экспрессирован в СНО-клетках (яйцеклетки китайского хомяка). Структурный анализ А17 показал сходство топологии активного центра абзима с активными центрами бутирилхолинэстеразы и ацетилхолинэстеразы (БуХЭ и АцХЭ соответственно).

Использование методов рентгено-структурного анализа и предстационарной кинетики позволило установить детальный механизм действия реакционноспособного антитела А17 [29]. Была предложена концепция “виртуального созревания” антител, составлена схема с применением методов квантово-механических расчётов и последующих вычислений на суперкомпьютере “Ломоносов” в МГУ. На примере исходного антитела А17, полученного из полусинтетической библиотеки генов иммуноглобулинов, удалось провести виртуальный скрининг более 35 тыс. мутантов и улучшить кинетические параметры по акцепции ФОТ. “Виртуально созревшее антитело” способно захватывать ФОТ на два порядка быстрее, чем исходное антитело, полученное методами селекции. Этот результат демонстрирует возможности современных методов широкоформатного скрининга библиотек генов и создания антител с заранее заданными свойствами с использованием вычислений на суперкомпьютере.

Представленный в докладе материал свидетельствует о современных возможностях создания стабильных в токе крови белковых препаратов терапевтического назначения с заранее заданными свойствами.

Автор выражает благодарность А.А. Белогурову, И.И. Воробьёву, А.В. Головину, В.Д. Кнорре, Н.А. Пономаренко, И.В. Степанову и А.В. Степановой за вклад в исследования, обобщённые в данной работе.

Работа поддержана грантом по контракту с Министерством образования и науки РФ RFMEFI60414X0069.

ЛИТЕРАТУРА

1. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N. et al. Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module // *Nat. Biotechnol.* 2003. № 12. P. 1486–1492.
2. Deyev S.M., Lebedenko E.N. Modern Technologies for Creating Synthetic Antibodies for Clinical application // *Acta Naturae.* 2009. № 1. P. 32–50.
3. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н., Петровская Л.Е. и др. Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами: оптимизация функций через направленное изменение структуры // *Успехи химии.* 2015. № 1. С. 1–26.
4. Chames P., Baty D. Bispecific antibodies for cancer therapy // *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 2009. № 12. P. 276–283.
5. Петров П.В., Хаумов П.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М.: ГЭОТАР-медиа, 2011.
6. Petrovskaya L.E., Shingarova L.N., Kryukova E.A. et al. Construction of TNF-binding proteins by grafting hypervariable regions of F10 antibody on human fibronectin domain scaffold // *Biochemistry.* 2012. № 1. P. 62–70.
7. Garas M.N., Tillib S.V., Zubkova O.V. et al. Construction of a pIX-modified Adenovirus Vector Able to Effectively Bind to Nanoantibodies for Targeting // *Acta Naturae.* 2014. № 2. P. 95–105.
8. Baklaushev V.P., Nukolova N.N., Khalansky A.S. et al. Treatment of glioma by cisplatin-loaded nanogels conjugated with monoclonal antibodies against Cx43 and BSAT1 // *Drug Deliv.* 2015. № 3. P. 276–285.
9. Efimov G., Kruglov A., Khlopchstnikova Z. et al. Cell type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. V. 113. № 11. P. 3006–3011. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1520175113>
10. Lerner R.A., Benkovic S.J., Schultz P.G. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies // *Science.* 1991. № 252. P. 659–667.
11. Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A. et al. DNA hydrolyzing autoantibodies // *Science.* 1992. V. 256. P. 665–667.
12. Gololobov G.V., Chernova E.A., Schourov D.V. et al. Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab fragment: application of the flow linear dichroism technique // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. № 1. P. 254–257.
13. Belogurov A., Smirnov I., Ponomarenko N., Gabibov A. Antibody-antigen pair probed by combinatorial approach and rational design: bringing together structural insights, directed evolution, and novel functionality // *FEBS Lett.* 2012. № 18. P. 2966–2973.
14. Kamerlin S.C., Warshel A. At the dawn of the 21st century: Is dynamics the missing link for understanding enzyme catalysis? // *Proteins.* 2010. № 6. P. 1339–1375.
15. Belogurov A.A., Stepanov A.V., Smirnov I.V. et al. Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis // *FASEB J.* 2013. № 1. P. 222–231.
16. Rudolph R., Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins // *FASEB J.* 1996. V. 10. P. 45–56.

17. Wang Y.S., Youngster S., Grace M. et al. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* V. 54. P. 547–570.
18. Przybycien T.M., Dunn J.P., Valax P., Georgiou G. Secondary structure characterization of beta-lactamase inclusion bodies // *Protein Eng.* 1994. V. 7. P. 131–136.
19. Lu H.S., Clogston C.L., Narhi L.O. et al. Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. Characterization of the disulfide-reduced intermediates and cysteine-serine analogs // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 8770–8777.
20. Vorobiev I., Matskevich V., Kovnir S. et al. Chemical polysialylation: Design of conjugated human oxymodulin with a prolonged anorexic effect *in vivo* // *Biochimie.* 2015. V. 95. P. 264–270.
21. Gregoriadis G., Jain S. Polysialylation: next generation to PEGylation // *Control. Rel. Soc. Newsl.* 2010. № 2. P. 21–23.
22. Iyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A. et al. Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 110. P. 1243–1248.
23. Smirnov I.V., Vorobiev I.I., Belogurov A.A. et al. Chemical Polysialylation of Recombinant Human Proteins // *Methods. Mol. Biol.* 2015. V. 1321. P. 389–404.
24. Eddleston M., Buckley N.A., Eyer P., Dawson A. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning // *Lancet.* 2008. V. 371. P. 597–607.
25. Macilwain C. Study proves Iraq used nerve gas // *Nature.* 1993. V. 363. P. 3.
26. Tu A.T. Basic information on nerve gas and the use of sarin by Aum Shinrikyo // *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan.* 1996. № 3. P. 293–320.
27. Smirnov I., Belogurov A., Friboulet A. et al. Strategies for the selection of catalytic antibodies against organophosphorus nerve agents // *Chem. Biol. Interact.* 2013. № 1. P. 196–201.
28. Smirnov I., Carletti E., Kurkova I. et al. Reactibodies generated by kinetic selection couple chemical reactivity with favorable protein dynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. V. 108. P. 15954–15959.
29. Ponomarenko N., Chatziefthimiou S.D., Kurkova I. et al. Role of $\kappa \rightarrow \lambda$ light-chain constant-domain switch in the structure and functionality of A17 reactibody // *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2014. № 3. P. 708–719.

НАУЧНАЯ СЕССИЯ ОБЩЕГО СОБРАНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ
И НОВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

© 2016 г. ДОКЛАД ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН В.И. КИСЕЛЁВА^а,
АКАДЕМИКА РАН М.А. ПАЛЬЦЕВА^{б, в}

^а Институт медико-биологических проблем ФГБОУ ВПО “Российский университет дружбы народов”,
Москва, Россия

^б Президиум Российской академии наук, Москва, Россия

^в Институт биохимической физики РАН, Москва, Россия

e-mail: vkis10@mail.ru; paltsev@presidium.ras.ru

Поступил в редакцию 20.01.2016 г.

Согласно концепции молодой научной дисциплины эпигенетики, уровень экспрессии генов в различных клетках и тканях организма в течение жизни индивидуума изменяется под влиянием внешних и внутренних факторов. Суть обратимых эпигенетических модификаций заключается в энзиматическом ковалентном присоединении/диссоциации функциональных химических групп к определённым нуклеотидам ДНК, а также к аминокислотным остаткам белков-гистонов хроматина. Двумя основными эпигенетическими модификациями являются метилирование ДНК и деацетилирование гистонов – механизмы, приводящие к ингибированию генной экспрессии.

Активное изучение роли эпигенетики в инициации и прогрессии злокачественных опухолей привело к формированию самостоятельного научного направления – эпигенетики рака. Стремительно растёт число публикаций, доказывающих эпигенетическую природу пролиферативных заболеваний органов репродуктивной системы, в частности, доброкачественных и предраковых патологий шейки матки, а также патологий эндометрия, сопровождающихся бесплодием.

Обратимость аномальных эпигенетических модификаций делает опосредующие её ферменты чрезвычайно привлекательными лекарственными мишенями при разработке таргетных эпигенетических препаратов. Ключевыми мишенями считаются ферменты ДНК-метилтрансфераза и гистондеацетилаза. В последнее время всё большее внимание учёных привлекают нетоксичные вещества природного происхождения, обладающие противоопухолевой эпигенетической активностью.

Проведённые авторами клинические исследования показали, что препараты индинол[®] форто (активное вещество – индол-3-карбинол) и эпигаллат[®] (активное вещество – эпигаллокатехин-3-галлат) (“МираксБиоФарма”, “ИльмиксГрупп”, Москва), назначавшиеся в составе комплексного лечения доброкачественных (ВПЧ-инфекции) и предраковых (CIN 1-2) заболеваний шейки матки, а также патологических процессов эндометрия, являются эффективными эпигенетическими средствами, приводящими к значимому деметилированию и восстановлению активности опухоль-супрессорных генов, нормализации клинической картины и отсутствию рецидивов указанных заболеваний спустя год после комплексного лечения. Установлено также, что данные препараты обращали аномальное ДНК-метилирование генов *HOXA10* и *HOXA11* и восстанавливали синтез кодируемых ими белков, опосредующих рецептивность эндометрия у пациенток, страдающих бесплодием на фоне хронического эндометрита.

Предлагаемые современные схемы комбинированной терапии с использованием эффективных и безопасных препаратов с эпигенетической активностью, восстанавливающих активность генов опухолевой защиты, окажутся новым мощным инструментом в лечении и профилактике распространённых гинекологических заболеваний, в том числе сопровождающихся бесплодием, и будут способствовать качественному улучшению репродуктивного здоровья нации.

Ключевые слова: эпигенетическая регуляция, ДНК-метилирование, заболевания шейки матки, патологические процессы эндометрия, рецептивность эндометрия, бесплодие.

DOI: 10.7868/S0869587316060116

КИСЕЛЁВ Всеволод Иванович – член-корреспондент РАН, заместитель директора ИМБП ФГБОУ ВПО “Российский университет дружбы народов”. ПАЛЬЦЕВ Михаил Александрович – академик РАН, главный учёный секретарь Президиума РАН, руководитель лаборатории ИБФ РАН.

Век двадцатый был веком торжества генетики. Нет сомнений в том, что век нынешний по праву — век эпигенетики.

Член-корреспондент РАН Б.Ф. Ванюшин

Генетика предполагает, а эпигенетика располагает.

*Питер Брайн Медавар,
лауреат Нобелевской премии*

ОТ КЛАССИЧЕСКОЙ ГЕНОЦЕНТРИЧЕСКОЙ КОНЦЕПЦИИ — К ЭПИГЕНЕТИКЕ

После открытия структуры ДНК в середине XX в. долгое время считалось, что исключительно генетический код организма, то есть последовательность нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК, определяет закономерности функционирования составляющих её генов и в широком смысле фенотип со всеми его признаками и проявлениями. Однако после успешного завершения в начале нынешнего тысячелетия грандиозного международного научно-исследовательского проекта “Геном человека” представления о функционировании генома претерпели существенные изменения. Вопреки ожиданиям оказалось, что вся информация о строении и функционировании человеческого организма заключена в 20–25 тыс. генов, а не 100–150 тыс., как предполагалось ранее согласно общепринятой концепции “один ген — один белок”. При этом собственно гены, кодирующие белки, составляют всего 1.5–2% от всей ДНК, а основная её часть представлена некодирующими нуклеотидными последовательностями. Таким образом, “огромный симфонический оркестр генов, который надеялись обнаружить учёные, уменьшился до размеров струнного квартета” [1]. Расчёты показали, что геном человека содержит около 8–10 мегабайт информации, что недостаточно для кодирования структуры, не говоря уже о функциях только одного такого сложного органа, как головной мозг [2]. Оставались без ответа и другие вопросы, неразрешимые с точки зрения общепринятой “центральной догмы молекулярной биологии”, согласно которой все свойства организма определяются исключительно генетическим кодом и поток информации может идти только в одном направлении — от ДНК к белкам и опосредуемой ими функции, но никогда наоборот. Например, вопросы, связанные с механизмами клеточной дифференцировки, протекающей не только в эмбриогенезе, но и при некоторых нормальных физиологических процессах во взрослом организме (кровообразование, сперматогенез, регенерация). Почему клетки различных органов и тканей, имея полученный по наследству одинаковый набор хромосом, в процессе развития и функционирования экспрессируют различные гены и белки, определяю-

щие их специализацию? Или почему генетически идентичные однояйцевые близнецы в течение жизни проявляют разную предрасположенность к болезням, в том числе и к тем, которые определяются генетическими факторами?

По мере прогресса фундаментальной науки и накопления практических данных стало понятно, что при безусловно главенствующей роли ДНК (базового носителя внутриклеточной информации в функциональном смысле) геном — это отнюдь не статичная, а чрезвычайно пластичная, “подвижная” структура, в которой, начиная со стадии морфогенеза у эмбриона и далее на протяжении всей жизни организма, уровень генной экспрессии постоянно меняется. Такая регуляция активности генов реализуется посредством эпигенетических модификаций, суть которых заключается в энзиматическом ковалентном присоединении/диссоциации функциональных химических групп к определённым нуклеотидам ДНК, а также к аминокислотным остаткам белков-гистонов, входящих в состав хроматина. В результате подавляется или, наоборот, активируется экспрессия функционально важных генов и, соответственно, уменьшается или увеличивается выработка кодируемых ими белков. Самыми известными и наиболее изученными эпигенетическими модификациями являются метилирование ДНК и деацетилирование гистонов — механизмы, приводящие к ингибированию генной экспрессии. ДНК-метилирование происходит по цитозиново-му остатку под действием фермента ДНК-метилтрансферазы в строго определённых участках гена — так называемых динуклеотидных островках CpG, которые содержатся в промоторной области подавляющего большинства генов. Деацетилирование гистонов катализируется гистондеацетилазой. Третий базовый механизм эпигенетической регуляции реализуется посредством микроРНК — особого класса коротких (19–25 нуклеотидов) некодирующих одноцепочечных молекул РНК. Для человека их сегодня известно около 2 тыс. Выключение гена при этом осуществляется путём предотвращения трансляции и синтеза функциональных белков в результате дефектной комплементарности между микроРНК и мРНК или путём деградации мРНК при полной комплементарности микроРНК и мРНК. По разным оценкам, мишенями микроРНК являются от 30 до 60% белоккодирующих генов человека (рис. 1).

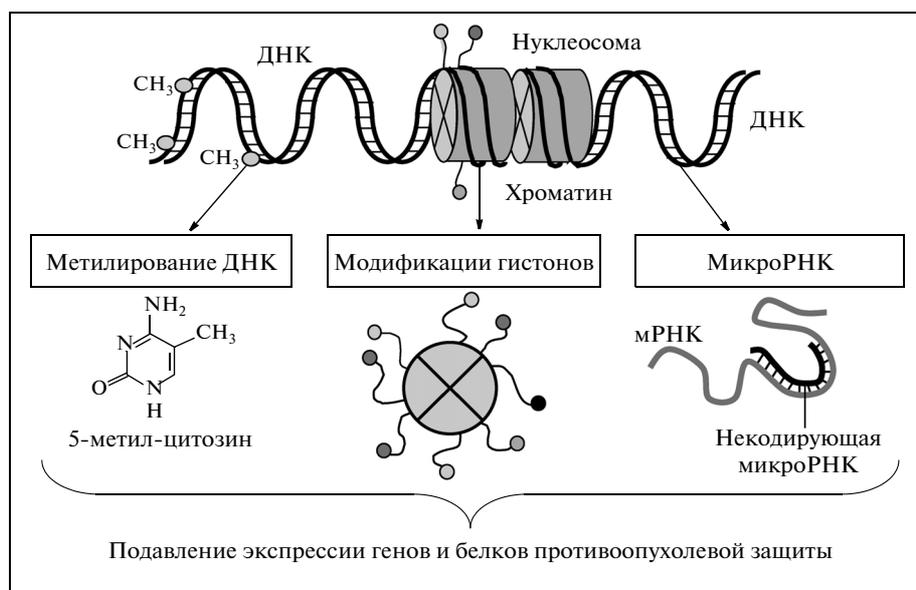


Рис. 1. Три механизма эпигенетической регуляции

Важно подчеркнуть, что эпигенетические модификации, называемые также эпимутациями, в отличие от истинных генетических мутаций не затрагивают структуру ДНК и являются потенциально обратимыми, то есть могут регулироваться факторами внутренней и внешней среды, такими как возрастные изменения, связанные со старением организма, особенности питания (диета), стрессовые воздействия, хронические патологические процессы, лекарственная терапия и даже психоэмоциональные стимулы.

Научно доказано, что эпигенетические изменения, вызванные средовыми стрессовыми факторами, при определённых условиях способны не только сохраняться при последовательных митотических делениях клетки, но и передаваться трём-четырёх следующим поколениям при мейозе. Признанию этого факта предшествовал многолетний спор сторонников и противников эпигенетики, считавших подобный подход возвратом к идеям ламаркизма с его “наследованием приобретённых признаков” – как казалось до последнего времени, навсегда отвергнутой лженауки.

Сегодня классическая геноцентрическая концепция радикально пересмотрена, и новая молодая научная дисциплина эпигенетика, допускающая возможность обратного направления потока информации от функции, находящейся под воздействием различных внешних и внутренних факторов, к соответствующему гену, по праву считается одной из самых изучаемых и перспективных в биологии (рис. 2). По значимости совершаемых в данной области открытий и масштабу разворачивающихся при этом перспектив как в фундаментальной науке, так и в практической медицине эпигенетика ставится в один ряд с такими эпохальными научными достижениями че-

ловечества в области естествознания, как теория эволюции Дарвина, открытия Менделя и установление структуры ДНК. Становится очевидно, что эпигеном высокоорганизованных многоклеточных организмов является полноценной “второй информационной системой”, которая обеспечивает дополнительный мощный информационный ресурс для сложной многоуровневой регуляции их жизнеобеспечения и функционирования, а фенотип любого организма представляет собой суммарную реализацию генома и эпигенома.

Сегодня для млекопитающих и человека, кроме процесса метилирования ДНК, известно около 10 способов посттранскрипционной модификации различных аминокислотных остатков в составе гистонов хроматина, так называемого “гистонового кода” (ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, АДФ-рибозилирование, биотинилирование, сумоилирование, изомеризация пролинового остатка и др.), и несколько тысяч молекул различных микроРНК. Поливариантные сочетания этих механизмов эпигенетической регуляции генной транскрипции создают поистине неограниченные возможности для расширения внутриклеточного информационного пула.

Доказано, что нарушение метилирования ДНК и других эпигенетических сигналов приводит к преждевременному старению и таким патологиям, как диабет, астма, псориаз, тяжёлые психические расстройства (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, аутизм, шизофрения), сердечно-сосудистые, хронические и инфекционные заболевания. Известно, что грибы, вирусы и другие инфекционные агенты путём модуляции метилирования ДНК способны переключать программу работы генов хозяина в свою пользу.

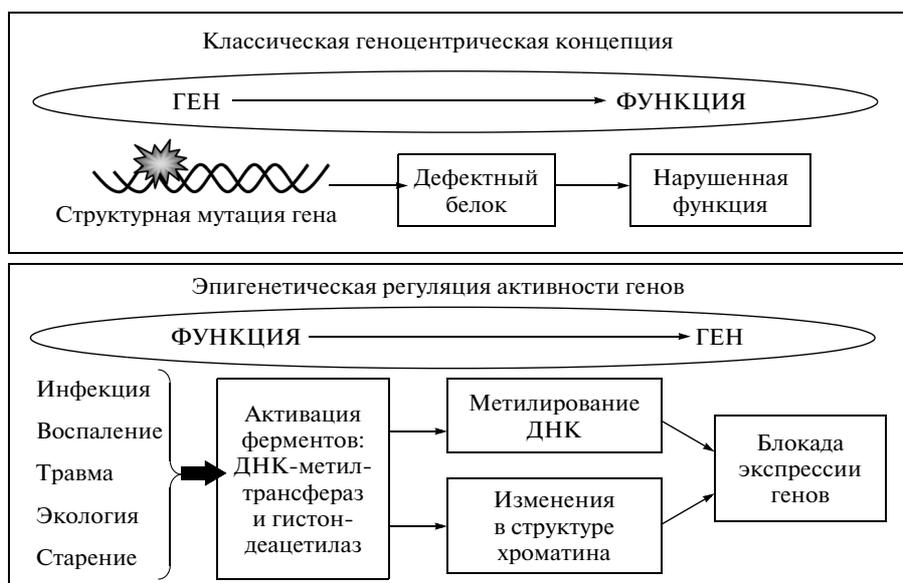


Рис. 2. От классической геноцентрической концепции к эпигенетике

Особенно активно изучается роль эпигенетики в инициации и прогрессии злокачественных опухолей, что привело к формированию отдельного, самостоятельного научного направления — эпигенетики рака [3, 4]. Практически при всех видах злокачественных новообразований уже на ранних этапах канцерогенеза возникают характерные эпигенетические нарушения, имеющие причинное значение. В подавляющем большинстве случаев это упоминавшиеся выше реакции аномального промоторного метилирования ДНК и деацетилирования гистонов, которые приводят к резкому подавлению экспрессии или к полной

инактивации генов, обеспечивающих онкопротекторные свойства организма. При этом выявленные эпигенетические маркёры не только служат молекулярными мишенями для новых таргетных противоопухолевых препаратов, но и являются основой для создания новых высокоселективных методов молекулярно-генетической онкодиагностики, клинического прогнозирования и мониторинга персонализированного лечения (рис. 3).

Стремительно растёт число публикаций, доказывающих эпигенетическую природу многих доброкачественных пролиферативных заболеваний репродуктивной системы, в частности, пато-

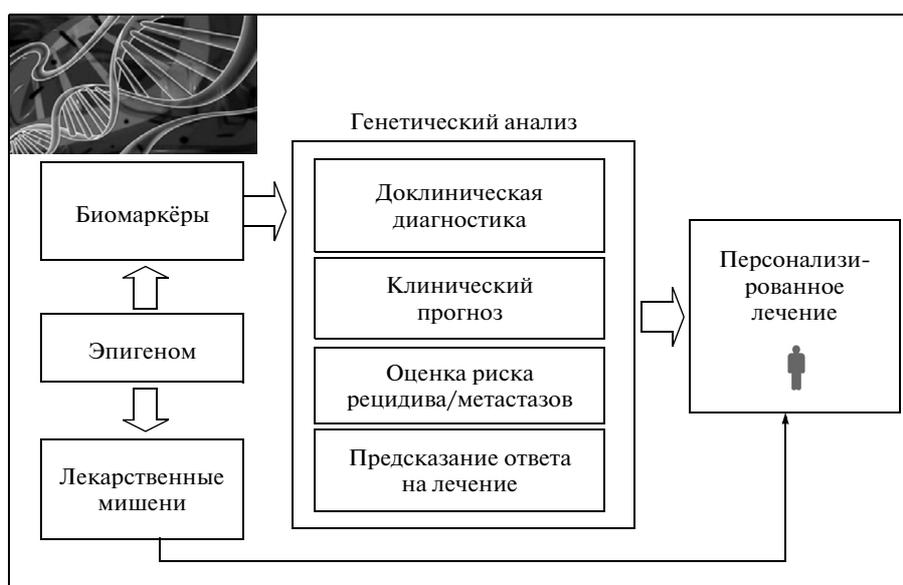


Рис. 3. Прикладное значение эпигенетики в ранней диагностике и лечении заболеваний

логий эндометрия, сопровождающихся бесплодием [5, 6, 7].

ВКЛАД РОССИЙСКИХ УЧЁНЫХ В РАЗВИТИЕ ЭПИГЕНЕТИКИ

Хотя эпигенетика формировалась и развивалась как самостоятельная научная дисциплина в основном благодаря усилиям и выдающимся достижениям западных исследователей, у её истоков стояло открытие, сделанное ныне здравствующим российским учёным, членом-корреспондентом РАН, профессором Борисом Фёдоровичем Ванюшиным. Ещё в 1970 г. им и его сотрудниками было обнаружено явление тканевой (клеточной) разнокачественности метилирования ДНК, то есть факт того, что в разных клетках одного и того же организма ДНК метилирована по-разному, а также впервые сформулировано представление о том, что ДНК-метилирование — это механизм регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки. Фактически это был первый материальный химически идентифицированный и расшифрованный эпигенетический сигнал [8]. В 1960–1970-х годах Б.Ф. Ванюшин с коллегами первыми показали, что уровень метилирования ДНК у позвоночных изменяется с возрастом [9, 10], а также то, что нарушение метилирования ДНК — это путь к раку [11]. Впоследствии работы русских учёных привлекли внимание многих исследователей за рубежом и послужили толчком к интенсивному изучению метилирования ДНК во всём мире.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ: ЧТО НОВОГО?

Обратимость аномальных эпигенетических модификаций делает ферменты, опосредующие эту обратимость, крайне привлекательными лекарственными мишенями при разработке таргетных эпигенетических препаратов. Ключевыми мишенями считаются ДНК-метилтрансфераза и гистондеацетилаза.

В 2000-х годах впервые два эпигенетических препарата, являющиеся ингибиторами ДНК-метилирования и предназначенные для лечения больных с миелодиспластическим синдромом, были официально зарегистрированы и разрешены к клиническому применению американским Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA). Это 5-аза-цитидин (вайдаза®) и родственный ему 5-аза-2'-дезоксцитидин, или децитабин (дакоген®). Однако наряду с доказанной терапевтической активностью данные препараты продемонстрировали и значительную токсичность, которая была частой причиной возникающих при их использовании серьёзных осложнений и отрицательных побочных эффектов. Поэтому основным требованием к эпигенетическим препаратам нового поколения, кроме их высокой эффективно-

сти и селективности, являются максимально сниженная токсичность и минимизация возникающих при их применении побочных эффектов. Ещё одна важная задача — получение новых эпигенетических препаратов в удобной для практического использования таблетированной форме (оба вышеуказанных лицензированных препарата являются инъекционными).

В последнее время всё большее внимание исследователей привлекают вещества природного происхождения, обладающие опухолеспецифической эпигенетической активностью. Среди нетоксичных веществ с эпигенетической активностью к самым перспективным относятся флавоноид эпигалло-катехин-3-галлат (EGCG), а также индолы — индол-3-карбинол (I3C) и его физиологический метаболит — 3,3'-дииндолилметан (DIM). Достоверно установлено, что данные соединения, известные как вещества с доказанной мультитаргетной противоопухолевой активностью, будучи абсолютно безопасными, обладают выраженной способностью ингибировать ферменты ДНК-метилтрансферазы и гистондеацетилазы, а также подавлять экспрессию проканцерогенных микроРНК. Как ДНК-деметирующий агент EGCG по эффективности ставится в один ряд с активным компонентом лицензированного эпигенетического препарата дакоген® — 5-аза-2'-дезоксцитидином [12, 13].

С учётом вышесказанного нами были разработаны препараты индинол® форто (активное вещество — I3C), эпигаллат® (активное вещество — EGCG) и цезарокс® (активное вещество — DIM в жидкой лекарственной форме, обладающий повышенной биодоступностью). Согласно результатам клинических исследований, проведённых нами совместно со специалистами ведущих медицинских учреждений РФ, была доказана высокая эффективность указанных препаратов как средств моно- и комбинированной терапии при лечении различных доброкачественных и предопухолевых заболеваний женской репродуктивной системы. При этом была подтверждена мультитаргетная активность препаратов. По окончании курса лечения отмечалось многократное снижение в тканях-мишенях количества белков — маркёров пролиферации, ангиогенеза, инвазии, воспаления и, напротив, повышения уровня проапоптотических белков и ферментов антиоксидантной защиты. Наряду с этим было показано, что данные препараты являются мощными эпигенетическими средствами. Так, у 102 больных репродуктивного возраста (средний возраст 31.4 ± 1.6 года) с доброкачественными (ВПЧ-инфекции) и предраковыми (CIN 1–2) заболеваниями шейки матки после 6-месячного курса терапии препаратами индинол® форто и эпигаллат®, проводившейся в составе комплексного лечения, наблюдалась нормализация клинической картины на фоне практически 100%-ного значимого деметилирования маркерных генов — супрессоров опухолевого ро-

Таблица 1. Уровень метилирования генов опухолевой защиты в биопсийных образцах у больных с заболеваниями шейки матки до и после комплексного лечения с применением препаратов на основе I3C и EGCG, %

Заболевание шейки матки	MLH1		HIC1		RASSF1A		MGMT		N33	
	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после
Доброкачественная ВПЧ-инфекция $n = 42$	2.4	0	7.1	2.4	4.8	0	2.4	0	0	0
CIN 1 $n = 33$	9.1	0	18.2	3.0	33.3	3.0	3.0	0	0	0
CIN 2 $n = 27$	33.3	6.1	59.3	6.1	44.4	6.1	6.1	0	14.8	0

ста (уровень метилирования определялся в образцах прицельной микробиопсии через один год после лечения). При этом исходно (до начала лечения) уровень метилирования генов был высоким и коррелировал со степенью неопластических изменений в цервикальном эпителии (табл. 1).

Важно отметить, что спустя год после комплексного лечения, включавшего приём препаратов индинол® форто и эпигаллат®, ни в одном случае не наблюдалось рецидивирования патологического процесса шейки матки. Между тем некоторые авторы отмечают, что частота рецидивов после хирургического или стандартного комплексного лечения данных нозологий составляет 5–30% [14–17]. На наш взгляд, применение препаратов на основе I3C и EGCG способствует деметилированию генов-супрессоров опухолевого роста, что характеризует их в качестве эффективных онкопротекторов при диспластических изменениях цервикального эпителия и диктует необходимость использования в составе комплексного лечения доброкачественных и предраковых патологий шейки матки.

Аналогичные результаты получены в другом исследовании, в ходе которого изучалась ДНК-демethylрующая активность двух упомянутых препаратов при лечении больных с патологическими процессами эндометрия. В исследовании участвовали 194 пациентки репродуктивного возраста

(средний возраст 36.5 ± 1.0 лет), рандомизированных в пять групп в соответствии со следующими пятью морфологически верифицированными диагнозами: хронический эндометрит ($n = 32$), полип эндометрия ($n = 31$), простая гиперплазия эндометрия без атипии ($n = 43$), сложная гиперплазия эндометрия без атипии ($n = 46$) и сложная гиперплазия эндометрия с атипией ($n = 42$). Во всех пяти группах шестимесячный приём указанных препаратов, проводившийся в составе комплексного лечения, приводил к значимой полной реверсии ДНК-метилирования маркерных опухоль-супрессорных генов (табл. 2).

Спустя год после проведенного комплексного лечения с применением препаратов на основе I3C и EGCG ни в одном случае не наблюдалось рецидивирования патологического процесса, хотя после предшествовавших этому стандартных курсов лечения процент рецидивирования указанных патологий у этих пациенток в разных группах составлял от 2.3 до 16% (1–2 рецидива) и от 2.2 до 6.4% (≥ 3 рецидивов).

Сегодня считается доказанной эпигенетическая природа низкой рецептивности эндометрия, которая является причиной подавляющего числа неудач при имплантации эмбриона, в том числе при проведении программ ЭКО, и одной из главных причин женского бесплодия. Согласно данным современной молекулярной медицины, к

Таблица 2. Уровень метилирования генов опухолевой защиты в биопсийных образцах у больных с заболеваниями эндометрия до и после комплексного лечения с применением препаратов на основе I3C и EGCG, %

Заболевание эндометрия	RASSF1A		MLH1		P16		RAR-β		GSTP1		CDX1	
	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после
Хронический эндометрит $n = 32$	0	0	3.1	0	0	0	0	0	3.1	0	0	0
Полип эндометрия $n = 31$	6.5	0	6.5	0	3.2	0	6.5	0	19.4	3.2	16.1	0
Простая гиперплазия без атипии $n = 43$	2.3	0	2.3	0	4.7	2.3	4.7	0	2.3	0	2.3	0
Сложная гиперплазия без атипии $n = 46$	6.5	0	8.7	0	2.2	0	6.5	0	15.2	2.2	10.9	0
Сложная гиперплазия с атипией $n = 42$	26.2	0	21.4	4.7	16.7	0	19.1	0	26.2	0	31.0	0

числу ключевых регуляторов процессов рецептивности эндометрия, предопределяющих фертильность, принадлежат гены и кодируемые ими белки *HOXA10* и *HOXA11* [18, 19]. Восстановление фертильности у женщин с эпигенетическими модификациями генов *HOXA10* и *HOXA11* при современных стандартах лечения бесплодия, ассоциированного с гинекологическими заболеваниями, маловероятно.

Методом бисульфитного секвенирования нами был исследован уровень промоторного метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11* в 25 биоптатах эндометрия, полученных у женщин репродуктивного возраста, страдающих бесплодием на фоне хронического эндометрита. Установлено, что статус метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11* может рассматриваться как потенциальный молекулярный маркер бесплодия, ассоциированного с гинекологическими заболеваниями, в частности с хроническим эндометритом. Причём уровень метилирования промоторного участка гена *HOXA10* коррелировал с длительностью периода диагностированного бесплодия. Согласно предварительным данным, разработанные нами препараты на основе веществ природного происхождения полностью обращали процесс аномального ДНК-метилирования указанных генов и восстанавливали синтез кодируемых ими белков, опосредующих рецептивность эндометрия. После шестимесячного курса комбинированной терапии с участием препаратов индинол® форто и эпигаллат® четырёх пациенткам из 25 удалось благополучно забеременеть (в настоящее время у всех пациенток беременность протекает нормально).

Есть все основания считать, что предлагаемые нами современные схемы комбинированной терапии с использованием эффективных и безопасных препаратов с эпигенетической активностью (в первую очередь ингибиторов ДНК-метилтрансфераз), восстанавливающих активность генов опухолевой защиты, окажутся новым мощным инструментом в лечении и профилактике распространённых гинекологических заболеваний, в том числе сопровождающихся бесплодием, и будут способствовать качественному улучшению репродуктивного здоровья нации.

Авторы выражают глубокую признательность за участие в проведении и организации клинических исследований, а также помощь в подготовке доклада Г.Т. Сухих, Л.И. Мальцевой, И.С. Сидоровой, А.Л. Унаняну, А.А. Полозникову, Е.Л. Муйжнек, Н.Н. Белушкиной. Научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы частично выполнены в ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» в рамках договора № 02.G25.31.0080 от 23 мая 2013 г. на реализацию комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства «Производство лекарственных средств на основе биотехнологий для лечения социально значимых заболеваний», финансируемого Минобрнауки РФ в соответствии с постановлением Правительства РФ № 218 от 9 апреля 2010 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чёрч Д. Гений в ваших генах: эпигенетическая медицина и новая биология намерения. СПб.: Изд. группа «Весь», 2010.
2. McCallum I. Ecological interrigence. Cape Town: Africa geographic. 2005. P. 5.
3. Esteller M. Epigenetics in cancer // N. Engl. J. Med. 2008. V. 358(11). P. 1148–1159.
4. Laird P.W. Cancer epigenetics // Hum. Mol. Genet. 2005. V. 14(1). P. R65–R76.
5. Guo S.W. Epigenetics of endometriosis // Mol. Hum. Reprod. 2009. V. 15(10). P. 587–607.
6. Banno K., Yanokura M., Susumu N. et al. Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer // Oncolog. Reports. 2006. V. 16(6). P. 1189–1196.
7. Domenico M.D., Santoro A., Ricciardi C., et al. Epigenetic fingerprint in endometrial carcinogenesis: the hypothesis of a uterine field cancerization // Cancer Biol. Ther. 2011. V. 12(5). P. 447–457.
8. Vanyushin B.F., Tkacheva S.G., Belozersky A.N. Rare bases in animal DNA // Nature. 1970. V. 225(5236). P. 948–949.
9. Бердышев Г.Д., Коротаев Г.К., Боярских Г.В., Ванюшин Б.Ф. Нуклеотидный состав ДНК и РНК соматических тканей горбуши и его изменение в течение нереста // Биохимия. 1967. Т. 32. С. 988–993.
10. Vanyushin B.F., Nemirovsky L.E., Klimenko V.V. et al. The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents // Gerontologia. 1973. V. 19(3). P. 138–152.
11. Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 805–832.
12. Pandey M., Shukla S., Gupta S. Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells // Int. J. Cancer. 2010. V. 126(11). P. 2520–2533.
13. Nandakumar V., Vaid M., Katiyr S.K. (-)Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells // Carcinogenesis. 2011. V. 32(4), P. 537–544.
14. Bodner K., Bodner-Adler B., Wierrani F. et al. Is therapeutic conization sufficient to eliminate a high-risk HPV infection of the uterine cervix? A clinicopathological analysis // Anticancer Res. 2002. V. 22(6B). P. 3733–3736.
15. Nuovo J., Melnikow J., Willan A.R., Chan B.K. Treatment outcomes for squamous intraepithelial lesions // Int. J. Gynaecol. Obstet. 2000. V. 68(1). P. 25–33.
16. Mitchell M.F., Tortolero-Luna G., Cook E. et al. A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization, and loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix // Obstet. Gynecol. 1998. V. 92(5). P. 737–744.
17. Bigrigg A., Haffenden D.K., Sheehan A.L. et al. Efficacy and safety of large-loop excision of the transformation zone // Lancet. 1994. V. 343(8888). P. 32–34.
18. Hsieh-Li H.M., Witte D.P., Weinstein M. et al. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility // Development. 1995. V. 121(5). P. 1373–1385.
19. Kwon H.E., Taylor H.S. The role of HOX genes in human implantation // Ann. NY Acad. Sci. 2004. V. 1034. P. 1–18.

БЕЗОПАСНЫЕ ЛЕКАРСТВА: МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН А.И. АРЧАКОВА, ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
О.М. ИПАТОВОЙ, ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН А.В. ЛИСИЦЫ,
ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК С.А. МОШКОВСКОГО

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

e-mail: inst@ibmc.msk.ru

Поступил в редакцию 23.12.2015 г.

Сегодня во всём мире усиливаются требования к безопасности и эффективности лекарственных средств, что приводит к росту расходов на их разработку. Однако, как показано в докладе, препараты-ксенобиотики не могут не вызывать побочных реакций, а увеличение числа препаратов на рынке, злоупотребление полипрагмазией и самолечением умножает количество неблагоприятных последствий, в том числе со смертельным исходом. Угроза здоровью таится и во взаимодействии лекарств с биологически активными добавками, отличающимися более низким уровнем сертификации, и в эффектах их применения, связанных с особенностями диеты и образа жизни пациента. Во избежание роста негативных последствий приёма лекарств следует развивать персонализированный подход к фармакотерапии ксенобиотиков, использующий результаты фармакогеномики и фармакометабомики, а также терапевтического лекарственного мониторинга с тщательным учётом возможных межлекарственных взаимодействий.

Ключевые слова: лекарственное средство, персонализированная медицина, фармакогеномика, терапевтический лекарственный мониторинг, полипрагмазия, лекарственное взаимодействие.

DOI: 10.7868/S0869587316060128

Безопасность лекарств – проблема здравоохранения. Требования к безопасности и эффективности разрабатываемых лекарственных средств постоянно растут, особенно в развитых странах. Рациональная, основанная на научном заделе разработка, многоступенчатые доклинические и клинические испытания сопряжены с существенными расходами при переходе от прототипа соединения, обеспечивающего терапевтический эффект, к применяющемуся в клинике препарату (рис. 1). По оценкам американского Центра исследования разработки лекарств, стоимость полного цикла создания нового лекарства, включая получение разрешения на широкое клиническое применение, составлявшая в 1990-е годы 600 тыс. долл., в начале 2000-х годов возросла до 1.5 млрд., а в 2015 г. равнялась 2.4 млрд. долл. [1]. Значительными являются и временные затраты: от первых

патентов до получения разрешения на применение обычно проходит 10–15 лет. Однако все усилия, направленные на минимизацию риска развития осложнений и нежелательных последствий, неспособны изменить сложившейся тенденции: частота побочных реакций от приёма лекарственных средств продолжает расти. Согласно данным широко известного Управления по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA), смертность, обусловленная побочными эффектами терапии ксенобиотиками, с 2004 г. возросла в этой стране почти в 3 раза (табл.). В итоге в 2013 г. в стране было зафиксировано около 118 тыс. таких смертей [2].

Увеличение числа назначаемых препаратов во многом обусловлено успехами в их разработке. Как же направить этот поток в разумное русло и избежать роста вызываемой новыми лекарствами заболеваемости и смертности? Решение этих проблем может быть достигнуто путём персонализации терапии, предполагающей учёт индивидуальных геномных данных пациента и особенностей метаболизма лекарств, в том числе возможных лекарственных взаимодействий.

Технологии персонализированной медицины при фармакотерапии. Связь метаболизма и транспорта лекарственных средств с полиморфизмом ге-

АРЧАКОВ Александр Иванович – академик, научный руководитель ИБМХ им. В.Н. Ореховича. ИПАТОВА Ольга Михайловна – доктор биологических наук, заведующая отделом нанолечеств ИБМХ им. В.Н. Ореховича. ЛИСИЦА Андрей Валерьевич – член-корреспондент РАН, директор ИБМХ им. В.Н. Ореховича. МОШКОВСКИЙ Сергей Александрович – доктор биологических наук, заведующий отделом персонализированной медицины ИБМХ им. В.Н. Ореховича.

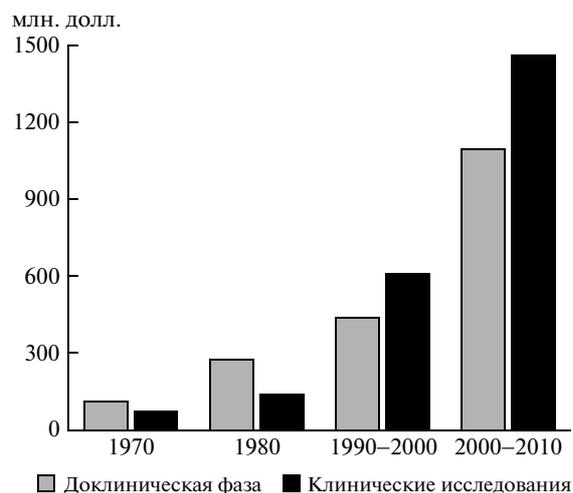


Рис. 1. Рост затрат на разработку нового лекарственного препарата, 1970–2010-е годы

Источник: данные Центра исследования разработки лекарств США [1]

нов, влияющих на эти процессы, давно установлена. Причём продукты полиморфизма могут участвовать в метаболизме лекарств-ксенобиотиков на всех стадиях – при их модификации, конъюгации и экскреции.

Модификация подавляющего большинства лекарств осуществляется за счёт окисления монооксигеназной системой с участием цитохромов P450. Ведущими изоформами этого надсемейства, участвующими в метаболизме лекарств в печени, являются CYP 3A4, 2D6, 2C8 и 1A2 [3]. Например, цитохром P450 3A4 метаболизирует примерно половину известных лекарств, включая парацетамол, циклоспорин, диазепам и эритромицин. Эта и другие биохимические системы модифицируют ксенобиотики с образованием интерме-

диатов, которые могут оказывать как терапевтическое (в случае использования в препаратах пролекарств), так и токсическое действие.

Современные представления о работе ферментативных систем, модифицирующих чужеродные для организма вещества, указывают на многообразие генерируемых при этом взаимодействии продуктов. Однако далеко не для всех лекарственных средств получена полная картина их метаболизма. Для его исследования применяется современная технология одновременного анализа совокупности метаболитов – *метаболомика лекарственных средств* [4]. Отметим, что, согласно имеющимся данным, почти любое чужеродное для организма и метаболизирующееся в нём лекарственное средство потенциально способно образовывать токсичные интермедиаты, вызывающие побочные эффекты разной степени тяжести. Перспективным подходом с точки зрения исключения токсичных интермедиатов является разработка неметаболизируемых лекарств, выводимых из организма в неизменном виде путём экскреции. К ним, например, относятся бисфосфонаты и некоторые ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента. Тем не менее даже не подлежащие метаболизму в организме средства вызывают тяжёлые побочные эффекты, связанные, например, с токсичностью в отношении почек.

Для коррекции фармакотерапии довольно давно используется метод определения некоторых генных вариантов. Так, при определении режима дозирования антиагрегантного препарата варфарина следует проводить оценку полиморфизма гена цитохрома P450 2C9, метаболизирующего это лекарство, и гена мишени препарата VKORC1 [5]. Прогнозирование развития побочных эффектов в виде миопатий при приёме гиполлипидемических средств статинов осуществляют

Рост неблагоприятных исходов в результате приёма лекарств в США

Год	Лекарственная смертность	Число серьёзных осложнений после приёма лекарств, в том числе повлёкших смерть, госпитализацию, инвалидность, врождённую аномалию
2004	34739	198828
2005	40031	256208
2006	37313	264240
2007	36689	272345
2008	49711	318565
2009	63842	373512
2010	82729	471327
2011	98590	573402
2012	118444	661480
2013	117752	711232

Источник: данные Управления по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (www.fda.gov).

посредством оценки полиморфизма гена транспортера лекарства SLCO1B1 [6]. Кроме того, известно ещё более десятка примеров использования на практике фармакогенетических тестов. Для предсказания ответа на лекарственные средства предлагаются также более производительные исследования геномов путём генотипирования на микрочипах и секвенирования нового поколения.

Если предсказать скорость метаболизма и дозировку лекарства посредством генотипирования не удаётся, например, когда метаболизм связан не с геномом, а с предшествующим образом жизни, исследуют фенотип больного при помощи терапевтического лекарственного мониторинга [7]. Этот метод обязан своим возникновением наблюдению разных ответов пациентов на одно и то же лечение и направлен на обеспечение выбора правильной индивидуальной дозировки лекарства и снижения риска побочных эффектов его применения.

Основными показаниями для разработки метода терапевтического мониторинга являются наличие данных о связи концентрации лекарственного средства в плазме крови и фармакологического эффекта, а также узкое терапевтическое «окно» препарата (рис. 2), то есть небольшой интервал между минимальной эффективной и минимальной токсической дозой и концентрацией лекарства в плазме (терапевтический индекс по П. Эрлиху) [8]. Сейчас проведение терапевтического лекарственного мониторинга рекомендовано для целого ряда препаратов, включая цитостатики, аминогликозидные антибиотики, противосудорожные средства и др. [9].

Таким образом, в силу особенностей метаболизма лекарств-ксенобиотиков подавляющее большинство из них вызывает побочное действие за счёт токсичности интермедиатов. Серьёзные токсические эффекты наблюдаются и у многих биологически активных добавок в связи с более низким качеством исследований, предвещающих их выход на рынок [10].

Взаимодействие лекарств и полипрагмазия. Специфические характеристики стадии модификации поступающих в организм препаратов приводят к их взаимному воздействию на метаболизм друг друга. В основном в фокусе этого процесса находятся упомянутые выше ферменты надсемейства цитохромов P450. Ксенобиотики могут ингибировать их изоформы, повышая риск передозировки других соединений, окисляющихся тем же ферментом. Есть вещества, которые, наоборот, индуцируют продукцию и активность цитохромов, что влечёт за собой быстрое разложение других лекарств в неактивные соединения и, соответственно, утрату ими эффективности.

При выпуске современных препаратов их взаимодействие с системой метаболизма хорошо ан-

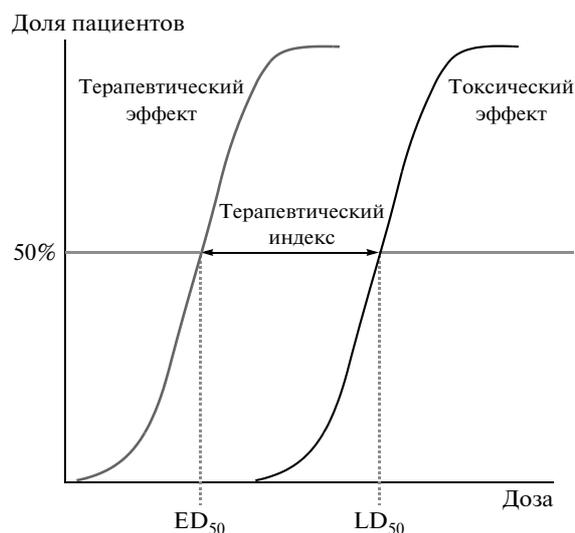


Рис. 2. Терапевтический индекс лекарственного препарата — ключевой показатель для терапевтического лекарственного мониторинга

ED₅₀ — полуэффективная доза препарата (медиана эффективной дозы), LD₅₀ — полулетальная доза (медиана летальной дозы)

нотируется. Пособия и веб-сайты для врачей эффективно предсказывают взаимодействия препаратов во избежание врачебных ошибок. Действует несколько интерактивных систем, позволяющих специалистам и пациентам оценивать взаимодействия назначаемых лекарств, для этого необходимо лишь иметь доступ к сети Интернет. Одна из широко используемых сегодня систем — справочник, расположенный на американском сайте www.drugs.com (рис. 3). Аналогичные сетевые продукты создаются в настоящее время и в русскоязычном сегменте Интернета. Поэтому даже большая опасность связана с тем, что активность цитохромов регулируется природными компонентами биоактивных добавок и продуктов питания. Например, природный фуранокумарин бергамоттин и его производные из грейпфрутового сока подавляют метаболизм ряда лекарств цитохромом P450 3A4 [11], а компоненты травы зверобоя, напротив, индуцируют этот фермент.

Фармакологические взаимодействия на уровне системы цитохрома P450 являются не единственными. Различают и другие формы взаимодействия, в частности, на уровне всасывания, электролитного обмена, системы гемостаза [12]. С учётом этого при назначении нескольких препаратов рутинной практикой становится персонализация дозировок или выбор терапевтического режима, а также консультирование относительно диеты, которой должен придерживаться пациент.

Сказанное позволяет заключить, что минимизация риска развития негативных последствий

Drug Interaction Report

Drug interactions for the following 3 drugs

Unsaved Drug List

clarithromycin

enalapril

Lipitor (atorvastatin)

Add / Remove drugs

Consumer

Professional

Major

Moderate

Minor

Food

Therapeutic Duplication

Interactions between your selected drugs

Major

clarithromycin <> atorvastatin

Applies to: clarithromycin, Lipitor (atorvastatin)

Talk to your doctor before using atorvastatin together with clarithromycin. Combining these medications may significantly increase the blood levels of atorvastatin. This can increase the risk of side effects such as liver

Рис. 3. Проверка взаимодействия липостатика аторвастатина и антибиотика кларитромицина с помощью специализированного ресурса (www.drugs.com)

приёма лекарств-ксенобиотиков зависит не только от продолжительности и тщательности поисковых, доклинических и клинических исследований при разработке нового препарата. Не менее важную роль играет методология фармакотерапии. Внедрение персонализированного подхода, лекарственного терапевтического мониторинга, развитие фармакогеномики и фармакометаболически, а также создание общедоступных ресурсов, позволяющих оперативно получать информацию о взаимодействии назначаемых препаратов, дают основание надеяться на уменьшение опасности негативных последствий приёма лекарств-ксенобиотиков. Вместе с тем развитие персонализированного подхода в фармакотерапии не упраздняет общемировую практику назначения взаимодействующих лекарств. При этом, по существующим оценкам, взаимодействия входящих в них средств могут быть потенциально опасными примерно в 20% случаев [13]. Кроме того, интенсивно растущий рынок лекарственных средств, совершенствование методов фармакотерапии и накопление знаний в этой области, безусловно, полезны для человечества в целом, одновременно вызывают увеличение приёма лекарственных препаратов

в популяции. Число принимаемых лекарственных средств, как показывают исследования, является основным фактором риска развития неблагоприятных побочных эффектов [14]. Таким образом, полипрагмазия, особенно у пожилых пациентов, оказывается одним из наиболее существенных рисков фармакотерапии.

Работа финансировалась в рамках Государственного задания Федерального агентства бюджетных организаций для ИБМХ им. В.Н. Ореховича, тема № 1 "Поиск постгеномных биомаркеров социально значимых заболеваний и разработка методов их детектирования" (№ 0518-2014-0002).

ЛИТЕРАТУРА

1. Mullin R. Tufts Study Finds Big Rise In Cost Of Drug Development // Chemical & Engineering News. American Chemical Society. 2014. <http://cen.acs.org/articles/92/web/2014/11/Tufts-Study-Finds-Big-Rise.html> (дата обращения 15.02.2016).
2. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Surveillance/AdverseDrugEffects/ucm070461.htm>

3. *Petushkova N.A., Pyatnitskiy M.A., Lisitsa A.V. et al.* Computational approach to characterization of human liver drug-metabolizing enzymes // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010. V. 41. P. 305–311.
4. *Trifonova O., Knight R.A., Lisitsa A. et al.* Exploration of individuality in drug metabolism by high-throughput metabolomics: The fast line for personalized medicine // *Drug Discov. Today.* 2015. V. 21. P. 103–110.
5. *Сычёв Д.А., Михеева Ю.А., Кропачева Е.С. и др.* Влияние полиморфизма гена CYP2C9 на фармакокинетику и фармакодинамику варфарина у больных с постоянной формой фибрилляции предсердий // *Клиническая медицина.* 2007. Т. 1. С. 57–60.
6. *Search Collaborative Group, Link E., Parish S. et al.* SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy – a genomewide study // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. P. 789–799.
7. *Дедов И.И., Тюльпаков А.Н., Чехонин В.П. и др.* Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы // *Вестник РАМН.* 2012. № 12. С. 4–10.
8. *Мирошниченко И.И.* Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. М.: Медицинское информационное агентство, 2011.
9. *Marshall W.J., Bangert S.K.* *Clinical Chemistry.* 6th Edition. Edinburgh, London: Mosby Elsevier, 2008.
10. *Geller A.I., Shehab N., Weidle N.J. et al.* Emergency Department Visits for Adverse Events Related to Dietary Supplements // *N. Engl. J. Med.* 2015. V. 373. P. 1531–1540.
11. *Bailey D.G., Dresser G.K.* Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs // *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* V. 4. P. 281–297.
12. *Сычёв Д.А., Отделенов В.А.* Межлекарственные взаимодействия в практике интерниста: взгляд клинического фармаколога // *Справочник поликлинического врача.* 2014. № 12. С. 18–21.
13. *Astrand B.* Avoiding drug-drug interactions // *Chemotherapy.* 2009. V. 55. P. 215–220.
14. *Thong B., Tan T.* Epidemiology and risk factors for drug allergy // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011. V. 71. P. 684–500.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ И КОНСТРУИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВ

© 2016 г. ДОКЛАД ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН С.Д. ВАРФОЛОМЕЕВА^{a, b},
КАНДИДАТА ХИМИЧЕСКИХ НАУК С.В. ЛУЩЕКИНОЙ^a,
ДОКТОРА ХИМИЧЕСКИХ НАУК А.В. НЕМУХИНА^{a, b}

^aИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: sdvarf@sky.chph.ras.ru; sofya.lushchekina@gmail.com; anem@lcc.chem.msu.ru

Поступил в редакцию 24.01.2016 г.

Достижения геномики, протеомики, экспоненциальный рост производительности вычислительной техники обеспечивают качественно новые возможности познания молекулярной природы “живого вещества” и, как следствие, расширение возможностей медицины. В докладе рассматриваются две научные области, в которых высокопроизводительные вычисления особенно эффективны. Первая из них — компьютерный дизайн лекарств, вторая — анализ молекулярного полиморфизма человека и индивидуальной чувствительности к лекарствам. Общие положения иллюстрируются конкретными примерами, в числе которых разработка нового класса антимиастенических препаратов — ингибиторов холинэстераз, исследование молекулярного полиморфизма аспартоацилазы головного мозга и выяснение природы болезни Канаван, изучение индивидуальной чувствительности к лекарствам — ингибиторам холинэстераз.

Ключевые слова: персонализированная медицина, молекулярная медицина, молекулярный полиморфизм человека, суперкомпьютерные технологии, молекулярное моделирование, высокопроизводительные вычисления, молекулярная динамика, квантовая химия, компьютерный дизайн лекарств, индивидуальная чувствительность к лекарствам.

DOI: 10.7868/S086958731606013X

ВОЗМОЖНОСТИ НОВЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Современные подходы к молекулярной медицине базируются на нескольких фундаментальных достижениях. Первое из них связано с расшифровкой генома человека. Появилась возможность получения генетического и протеомно-молекулярного портрета любого человека, выявления индивидуальных различий людей на генетическом и белковом уровнях. При общей и единой организации генома индивидуальные различия в значительной степени формируются за счёт

единичных замен в структуре ДНК и, как следствие, за счёт точечных замен в структуре белков как продуктов экспрессии гена или участников процесса его экспрессии. Возникающий молекулярный полиморфизм человека определяет предрасположенность к различным патологиям и в итоге — к развитию заболеваний [1–3].

Нельзя не отметить достижения в исследованиях молекулярной трёхмерной структуры белков. Методы рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса в настоящее время обеспечивают информацию о структуре огромного числа белков, в первую очередь белков человека. В базе данных Protein Data Bank (PDB) хранится информация о более чем 120 тыс. белков, причём с атомарным разрешением, и объём данных продолжает экспоненциально увеличиваться [4]. Можно утверждать, что мы уже знаем атомарную структуру большинства белков человека, а при отсутствии прямых экспериментальных данных для какого-либо белка его структура с высокой точностью может быть предсказана с помощью компьютерного молекулярного моде-

ВАРФОЛОМЕЕВ Сергей Дмитриевич — член-корреспондент РАН, научный руководитель ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, заведующий кафедрой химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. ЛУЩЕКИНА Софья Владимировна — кандидат химических наук, старший научный сотрудник ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН. НЕМУХИН Александр Владимирович доктор химических наук, заведующий лабораторией ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, заведующий лабораторией химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

лирования путём компьютерной модификации белка-гомолога.

К числу достижений относится и появление высокопродуктивных и точных автоматизированных экспериментальных методов идентификации белков человека. Наиболее эффективная и быстро развивающаяся методология базируется на масс-спектропии белков. Применение оборудования, обладающего высокой точностью измерения масс, позволяет в одном образце идентифицировать до 1000 белков, а это поможет исследователям подняться на качественно новый уровень изучения молекулярного полиморфизма человека и диагностики заболеваний [5, 6].

Несомненным достижением стала также возможность молекулярного моделирования с использованием суперкомпьютерных технологий и проведением большого числа вычислительных операций. На основе фундаментальных физических законов ставятся вычислительные задачи, позволяющие получать важнейшую информацию о свойствах сложных молекулярных систем. Речь идёт о понимании и визуализации перемещения ядер атомов с образованием в высшей степени нестабильных промежуточных соединений, при этом процессы протекают в микро- или пикосекундном интервале времени. Динамика этих процессов определяется структурой биомолекулы и реагирующего соединения и, таким образом, генетической полиморфной структурой гена. Связь между структурной особенностью белка и динамическими характеристиками элементарных процессов в конечном счёте определяет эффективность и особенности физиологического ответа на лекарственное воздействие.

Существуют две области применения компьютерных технологий, в которых высокопроизводительные вычисления особенно эффективны, — это компьютерный дизайн лекарств и анализ молекулярного полиморфизма человека и индивидуальной чувствительности к лекарствам.

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ДИЗАЙН ЛЕКАРСТВ

В последнее время быстрыми темпами развивается новый подход к поиску лекарств, базирующийся на знании структуры биополимерной молекулы-мишени, развитой технике молекулярно-механического моделирования и использовании вычислительных технологий высокой производительности. Методология позволяет на начальном этапе работы провести выбор соединения или группы соединений, потенциальных лекарственных препаратов путём компьютерного поиска соответствия структуры активного центра мишени и лиганда. С применением этого подхода удаётся исследовать до миллиона структур молекул и на основании энергетического критерия выбрать структуры, наиболее эффективно взаи-

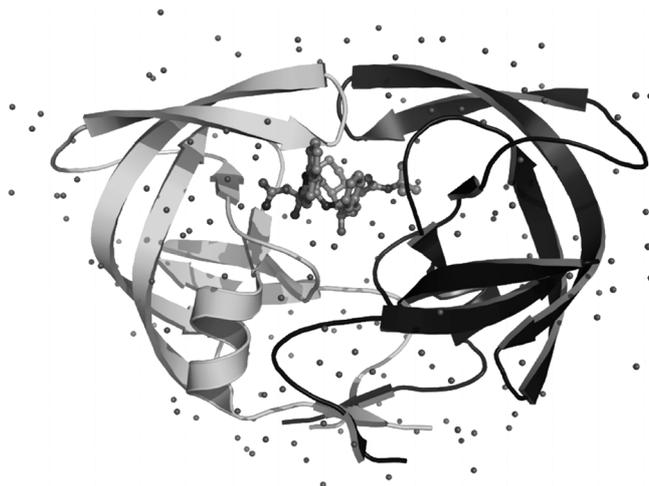


Рис. 1. Протеаза ВИЧ с ингибитором Saquinavir в активном центре (кристаллографическая структура PDB ID 2NNP [4])

модействующие с мишенью. Фармацевтические компании используют этот подход на первичном этапе поиска лекарственных препаратов для выявления соединения-лидера и последующей его модификации с улучшением фармакологических свойств [7, 8].

В качестве белков-мишеней в первую очередь рассматриваются следующие ферменты: киназы (протеинкиназы, тирозинкиназы, циклинзависимые киназы 1 и 2, киназа гликогенсинтетазы, тирозинкиназы лимфоидных клеток и др.), протеазы (катепсин D, фалципаин-2, протеаза ВИЧ (рис. 1), плазмепсин II, тромбин), гидролазы (ацетилхолинэстераза, аденилатциклаза, β -лактамаза, фосфодиэстераза, протеин-тирозин фосфатаза), оксидоредуктазы (альдозоредуктаза, дигидрофолат редуктаза и др.). Также активно изучаются ингибиторы трансформилаз, карбонгидраз, ДНК-гираз, фарнезилтрансферазы, ВИЧ-интегразы, т-РНК-гуанин трансгликозидазы. Выбор и идентификация мишени определяются информацией об изменении метаболизма при развитии патологического состояния. Перечень ферментов-мишеней непрерывно расширяется.

Значительный интерес представляют белки — ионные каналы и рецепторы (селективные Ca^{2+} каналы Т-типа, калиевые каналы и др.) — мощные регуляторы клеточного ответа. В роли других мишеней часто выступают низкомолекулярные вещества, влияющие на белок-белковые взаимодействия. Рецепторы как агенты, отвечающие за передачу информации между клетками различной природы и являющиеся предметом воздействия потенциальных лекарственных средств, также представляют большой интерес в качестве мишеней.

Процедура компьютерного моделирования мишени и лиганда основана на принципах молекулярной механики и обеспечена многочисленными программными продуктами [9]. Отметим, что компьютерное моделирование и разработка дизайна молекулы-лекарства не освобождают фармацевтическую компанию от традиционных процедур токсикологических и клинических испытаний, однако существенным образом ускоряют ход исследования и кардинально уменьшают стоимость работ на стадии доклинических испытаний. Известны многочисленные примеры успешного доведения результатов компьютерного дизайна молекулы до клинического применения молекулы-лекарства. Большая часть современных и широко используемых препаратов прошла стадию компьютерного дизайна и структурной оптимизации, в том числе captopril (Capoten®, Bristol Myers-Squibb), saquinavir (Invirase®, Hoffman-La Roche), zanamivir (Relenza®, Gilead Sciences), nizatidine (Zantac®, Schering-Plough), dorzolamide (Trusopt®, Merck) и др. [8].

Хотя в компьютерном конструировании лекарств накоплен большой практический опыт и достигнуты очевидные успехи, существуют три проблемы, без решения которых однозначный положительный результат недостижим. Первая из них состоит в том, что возможно действие препарата на несколько мишеней, в том числе на индуцирующие токсическое действие и включённые в метаболические пути. Примеров такого действия очень много. Практически любой препарат, используемый в дозах, превышающих терапевтическую, вызывает токсикоз. Классический пример: анальгетик фентонил – лиганд нейропептид-морфиновых рецепторов – при высокой концентрации вызывает остановку дыхания [10]. Очевидный путь решения этой проблемы на основе компьютерных технологий – создание обобщённой базы данных всех белков человека, а также программного обеспечения, позволяющего сканировать все возможные взаимодействия исследуемого лиганда с потенциальными мишенями. При этом граница положительных и отрицательных взаимодействий может быть задана константой сродства лиганд–мишень. Можно с уверенностью утверждать, что такого рода задача будет решена в ближайшее время.

Вторая проблема касается взаимодействия мишени с лигандом. Это сложный динамический процесс, сопровождающийся конформационными изменениями как лиганда, так и мишени. Структура макромолекулы (белка) не жёсткая, она подвижна и порой может претерпевать существенные конформационные изменения по сравнению с моделью, построенной на основе статических кристаллографических данных. В ряде случаев существенную роль играет динамика связывания лиганда (ингибитора) с белком и алло-

стерическая модуляция. В рамках молекулярно-механического подхода и при всём разнообразии методов молекулярного докинга учёт конформационной подвижности белка-мишени имеет существенные ограничения, в частности, полностью выпадает из рассмотрения динамическая составляющая взаимодействия с лигандами, ингибиторами или активаторами. Для более адекватного моделирования взаимодействий необходимо зачастую использовать молекулярно-динамические методы.

В случаях, когда взаимодействие белка и ингибитора или субстрата включает образование и разрыв ковалентных связей, методы, основанные только на классической механике, оказываются принципиально неприменимы и требуют обязательного учёта законов квантовой химии. С развитием суперкомпьютерных методов стало возможным использование комбинированных классических и квантовых схем, рассматривающих макромолекулу целиком и с растворителем, не прибегая к вырезанию малого реакционного кластера в вакууме.

Ждёт своего решения и третья проблема, связанная с компьютерным моделированием лекарств. Дело в том, что вариабельность структуры белка-мишени основывается на молекулярном полиморфизме организма человека [1]. Индивидуальные особенности структуры белка-мишени могут полностью нивелировать действие лекарства, то есть не обеспечивать терапевтического эффекта. Более того, молекулярный полиморфизм способен вызывать обратный эффект. Пример такого рода – действие миорелаксанта сукцинилхолина, широко применяемого анестезиологами при хирургических операциях. На протяжении многих лет врачами фиксировались отдельные случаи, когда этот препарат проявлял себя как яд нейропаралитического действия. Физико-химическое объяснение этого феномена достижимо при молекулярном моделировании процессов на базе суперкомпьютерных вычислений.

СУПЕРКОМПЬЮТЕРНЫЕ ВЫЧИСЛЕНИЯ В АНАЛИЗЕ СЛОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ БЕЛОК-ЛИГАНДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Молекулярная динамика. В настоящее время развитие суперкомпьютерных мощностей, молекулярно-динамических программ и силовых полей позволяет с достаточной надёжностью моделировать биомолекулярные системы с учётом молекул растворителя и ионов размером до нескольких сотен тысяч атомов. Масштаб времени моделирования может достигать микросекунд. При этом решаются уравнения Ньютона с использованием различных методов интегрирования, и для каждого атома в каждый момент времени определяется его координата и скорость движения. Температура моделируемой системы, её

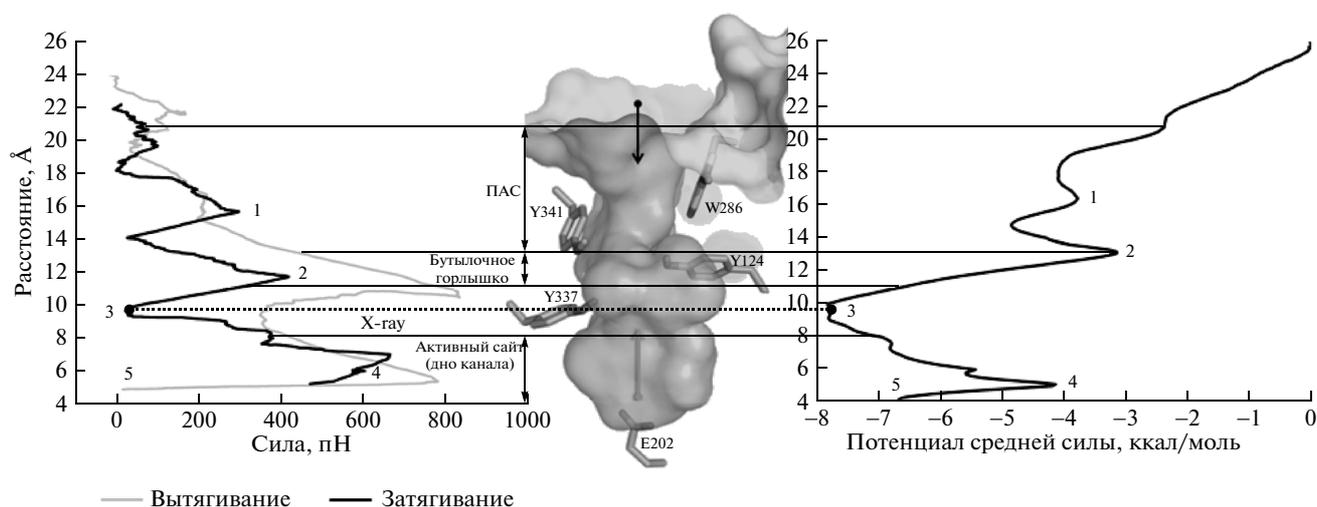


Рис. 2. Молекулярное моделирование процесса ингибирования ацетилхолинэстеразы соединением C547

Слева: профиль силы для процессов ингибирования АХЭ соединением C547 и диссоциации фермент-ингибиторного комплекса. В методе направленной молекулярной динамики к группе атомов ингибитора прилагается внешняя сила, заставляющая его двигаться вдоль канала АХЭ с постоянной скоростью (в данном случае 1 Å/нс). Вдоль траектории (расстояние от активного сайта отложено по оси ординат) регистрируется величина прикладываемой силы (отложено по оси абсцисс), необходимой для движения с заданной скоростью на данном участке. Моделирование проводилось для процесса затягивания ингибитора в канал и для вытягивания. *Справа:* рассчитанный потенциал средней силы для соответствующей профилю свободной энергии вдоль траектории (отложено по оси абсцисс). В середине рисунка – строение канала АХЭ для соотнесения соответствующих участков на графиках. Пунктиром отмечено положение, полученное при помощи кристаллографии (см. рис. 3)

объём или давление поддерживаются при помощи алгоритмов, называемых термостатами и баростатами. Всё вместе это позволяет проследить конформационную изменчивость молекулы белка и динамические свойства её взаимодействия с ингибитором.

Активно развиваются вариации метода молекулярной динамики в целях решения задач для тех или иных специфических полей: наложения определённых ограничений на группы атомов, приложения внешних сил и магнитных полей. Методы расчёта свободной энергии различных процессов постоянно улучшаются с целью повышения точности и экономии времени.

Рассмотрим возможности и особенности современных подходов на нескольких примерах.

Новый класс антимиастенических препаратов. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы. В Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН доктором химических наук В.С. Резником синтезировано вещество под кодовым названием C547, которое рассматривается в качестве перспективного препарата для терапии различных синдромов мышечной слабости. В кинетических экспериментах, выполненных в Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН, и экспериментах на животных, проведённых в Казанском государственном медицинском университете кандидатом биологических наук К.А. Петровым под руководством академика РАН Е.Е. Никольского, были выявлены необычные кинетические свой-

ства этого соединения, а также существенно увеличенное время терапевтического эффекта по сравнению с длительностью действия представленных на рынке лекарств.

Механизм взаимодействия этого вещества с ферментом ацетилхолинэстеразой исследовался в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН с использованием вычислений на суперкомпьютере «Ломоносов» МГУ [11]. В этой связи необходимо отметить, что в настоящее время Суперкомпьютерный центр МГУ им. М.В. Ломоносова располагает вычислительными мощностями мирового уровня. По состоянию на ноябрь 2015 г. суперкомпьютер «Ломоносов-2» с пиковой производительностью 1.85 петафлопса занимал 36-ю позицию в списке 500 самых мощных вычислительных систем мира (первое место – у суперкомпьютера с пиковой производительностью 33.86 петафлопса, находящегося в китайском городе Гуанчжоу). Сегодня усилия нескольких групп разработчиков в разных странах направлены на создание суперкомпьютера с эксафлопсной производительностью, то есть совершающего 10^{18} операций с плавающей точкой в секунду.

Характерной особенностью ферментов семейства холинэстераз является длинный канал (~25 Å), ведущий к активному сайту (рис. 2). Молекулярное моделирование процесса ингибирования ацетилхолинэстеразы соединением C547 с использованием методов направленной молекулярной динамики и расчёта потенциала средней силы показали, что оно происходит в два этапа.

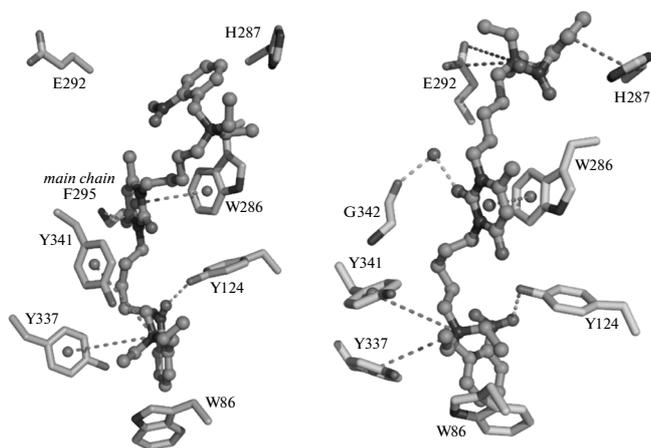


Рис. 3. Положение лиганда в канале АХЭ в кристалле комплекса (слева) и по результатам молекулярно-динамического моделирования (справа)

Характерной особенностью является положение тетраалкиламмониевой группы ниже “бутылочного горлышка” (Tyr341 и Tyr124, на рисунке приведены однобуквенные коды, Y для тирозина), но выше активного центра (не показан на рисунке). Подвижность белка в кристалле существенно ограничена, поэтому положение, полученное при помощи молекулярно-динамического моделирования, отличается большим числом контактов лиганда с боковыми цепями аминокислот белка, что отражает явление индуцированного соответствия

Сначала быстро образуется комплекс ингибитора с периферическим анионным сайтом (ПАС), находящийся у входа в канал на расстоянии 21–13 Å от активного сайта (область 1 на рис. 2). Затем ингибитору необходимо преодолеть узкое место в канале на участке 13–11 Å, именуемое “бутылочным горлышком”, образованным боковыми цепями аминокислотных остатков Tyr124 и Tyr341 (область 2 на рис. 2). Это происходит довольно медленно из-за больших объемов ингибитора, после чего он крепко связывается с пространством под “бутылочным горлышком” на уровне 9–10 Å от активного центра (область 3 на рис. 2). Положение ингибитора в активном центре, смоделированное с помощью молекулярного докинга, также очень энергетически выгодно (область 5 на рис. 2), но чтобы в нём разместиться, ингибитору, необходимо преодолеть слишком большой энергетический барьер (область 4 на рис. 2). При рассмотрении обратного процесса – диссоциации фермент-ингибиторного комплекса – установлено, что при направленной молекулярной динамике для вытягивания ингибитора из канала необходимы существенно большие усилия, чем для втягивания, что выражается в гораздо более высоких барьерах на профиле потенциала средней силы. Это объясняет обнаруженную в ходе кинетических экспериментов кажущуюся необратимость действия ингибитора и многократное увеличение продолжительности действия препарата при экспериментах на животных [12].

Результаты моделирования позволили поставить новый эксперимент по изучению кинетики медленного связывания. Полученные результаты соответствуют кинетике медленного связывания типа Б (см. подробный обзор механизмов ингибирования медленного действия [13]), который предполагает быстрое формирование комплекса фермент–ингибитор EI и его медленную изомеризацию в комплекс EI*, соответствующим областям 1 и 3 на рисунке 2.

Полученная позднее кристаллографическая структура комплекса ингибитора с ферментом подтвердила предсказанное при помощи молекулярного моделирования положение ингибитора в канале ацетилхолинэстеразы ниже “бутылочного горлышка”, но выше активного сайта (рис. 3).

СУПЕРКОМПЬЮТЕРНЫЕ ВЫЧИСЛЕНИЯ В АНАЛИЗЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ЧЕЛОВЕКА И ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЛЕКАРСТВАМ

В соответствии с одной из основных парадигм современной молекулярной медицины предрасположенность к заболеваниям связана с генетическими вариациями структуры белков или процессов их экспрессии. Действительно, предрасположенность к социально значимым патологиям, включая сердечно-сосудистые, онкологические, респираторные, диабет и даже инфекционные заболевания, на базовом уровне имеет генетическую основу, проявляющуюся в конечном счёте в структуре белка или уровне его экспрессии. Индивидуальные структурные различия белков человека основаны в большинстве случаев на единичных заменах оснований в структуре гена (single nucleotide polymorphism – SNP). В работах [14, 15] на основе статистического анализа и методов биоинформатики разработан подход, оценивающий значимость замены аминокислот для катализа и структуры белка (вычисления энтропии Шеннона для каждой позиции в последовательности аминокислот). Замена аминокислот, формирующих активный центр или трёхмерную структуру молекулы, ведёт к потере функциональной активности. Вместе с тем до 80% позиций аминокислот переменны. Однако в каждом конкретном случае необходим анализ, поскольку эти замены могут изменить каталитические характеристики, субстратную специфичность, стабильность белка.

Современный подход к ответу на вопрос о роли той или иной аминокислоты в функционировании белковых систем основан на детальном кинетическом моделировании динамики белковой молекулы в целом с использованием молекулярно-динамических методов и элементарных актов ферментативного катализа методами квантово-

химических расчётов (комбинированный метод квантовой и молекулярной механики – КМ/ММ). В настоящее время этот подход становится доступным при использовании суперкомпьютерных технологий. Отметим, что прорывные работы в области создания методов молекулярного моделирования химических и биологических систем по достоинству оцениваются мировым научным сообществом, о чём свидетельствует присуждение Нобелевской премии по химии 2013 г. А. Варшелу, М. Левиту и М. Карплюсу.

КМ/ММ приближение. На основе известных фактов (или на базе энтропийно-информационного анализа [14, 15]) в трёхмерной структуре белка выделяется участок (активный центр), в пределах которого происходит перераспределение электронных плотностей и перемещение ядер в процессе каталитического цикла. Совокупность этих атомов может быть физически описана в рамках квантово-химического приближения (базовое уравнение – уравнение Шрёдингера). Остальная часть молекулы описывается классическим приближением, основанным на уравнениях классической механики (уравнение Ньютона). Современные суперкомпьютеры обеспечивают возможность анализа квантово-химического приближения до 200–250 атомов, включая большое количество молекул воды. Основы подхода и приложения изложены в [16]. Физическая задача сводится к расчёту поверхностей потенциальной энергии, описывающей взаимодействие ядер и электронов с идентификацией экстремумов по координате реакции. Химическая интерпретация даёт возможность идентифицировать структуры промежуточных соединений (минимумы потенциальной энергии) и переходных состояний (максимумы потенциальной энергии). В итоге расчёты позволяют определить энергетические барьеры на элементарных стадиях реакции и вычислить константы скорости, характеризующие эти стадии [17, 18].

В изучении молекулярных механизмов действия биомолекул данный подход невозможно переоценить. Методология компьютерного вычисления молекулярных трансформаций веществ базируется на фундаментальных законах природы, позволяет визуализировать процессы перемещения ядер с идентификацией промежуточных соединений и переходных состояний элементарных стадий. С точки зрения анализа молекулярного полиморфизма задача сводится к сравнению реакционной способности (константы скорости) на отдельных стадиях для нормального белкового катализатора и его SNP-модификанта.

В качестве иллюстрации рассмотрим два конкретных примера.

Аспартоацилаза головного мозга. Болезнь Канаван. Аспартоацилаза представляет собой гидролазу семейства карбоксипептидаз с ионом цинка в

активном центре. Фермент осуществляет гидролиз N-ацетиласпарагиновой кислоты (NAA) с образованием уксусной и аспарагиновой кислот. N-ацетиласпарагиновая кислота представлена в белом веществе мозга млекопитающих в высокой концентрации. Нарушения концентрации NAA проявляются при различных патологиях мозга: травмах, болезни Альцгеймера, шизофрении, множественном склерозе. Наиболее известное заболевание – болезнь Канаван (названа по имени её первооткрывателя – американской исследовательницы М.М. Канаван), характеризующаяся аномально высокой концентрацией NAA в белом веществе головного мозга и неспособностью фермента обеспечить уровень концентрации на физически приемлемом уровне. Анализ показывает, что болезнь Канаван имеет молекулярно-поллиморфную природу и связана с некоторыми SNP (единичными заменами нуклеотидов) в кодирующем гене [19].

Было проведено полное детальное молекулярное моделирование взаимодействия фермента с субстратом. КМ часть включала 125 атомов (His21, Glu24, Arg63, Arg71, His116, Asn117, Thr118, Arg168, Glu178, Glu285, NAA, две молекулы воды), ММ часть – 4500 атомов белка, первую сольватную оболочку. Построен полный профиль поверхности потенциальной энергии с идентификацией структур семи промежуточных соединений и соответствующих переходных состояний. Показано, что образование промежуточного тетраэдрического интермедиата и выхода продукта конкурирует за скорость-лимитирующие стадии взаимодействия. В настоящее время идентифицировано более 30 SNP и соответствующих единичных замен в структуре белка. Наиболее значимы замены Lys213Glu, Tyr231Cys, Glu285Ala, Phe295Ser. Анализ профилей потенциальной энергии показывает, что замена Glu285Ala практически на 29 ккал/моль увеличивает энергию активации лимитирующей стадии, при замене Phe295Ser увеличивается расстояние для нуклеофильной атаки и барьера переноса протона. Для замены Lys213Glu расстояние для нуклеофильной атаки увеличивается до 3Å и, соответственно, уменьшается скорость реакции, при замене Tyr231Cys наблюдается искажение активного центра (Arg71 не ориентирует NAA, искажает положение каталитической глутаминовой кислоты). Наиболее драматические изменения связаны с заменой Glu285Ala, что объясняет физиологические проявления болезни Канаван у людей с этой полиморфной заменой.

Холинэстеразы. Индивидуальная чувствительность к лекарствам. К семейству холинэстераз принадлежат два фермента: ацетилхолинэстераза, гидролизующая нейромедиатор ацетилхолин, и бутирилхолинэстераза (БХЭ), обладающая гораздо более широкой субстратной специфично-

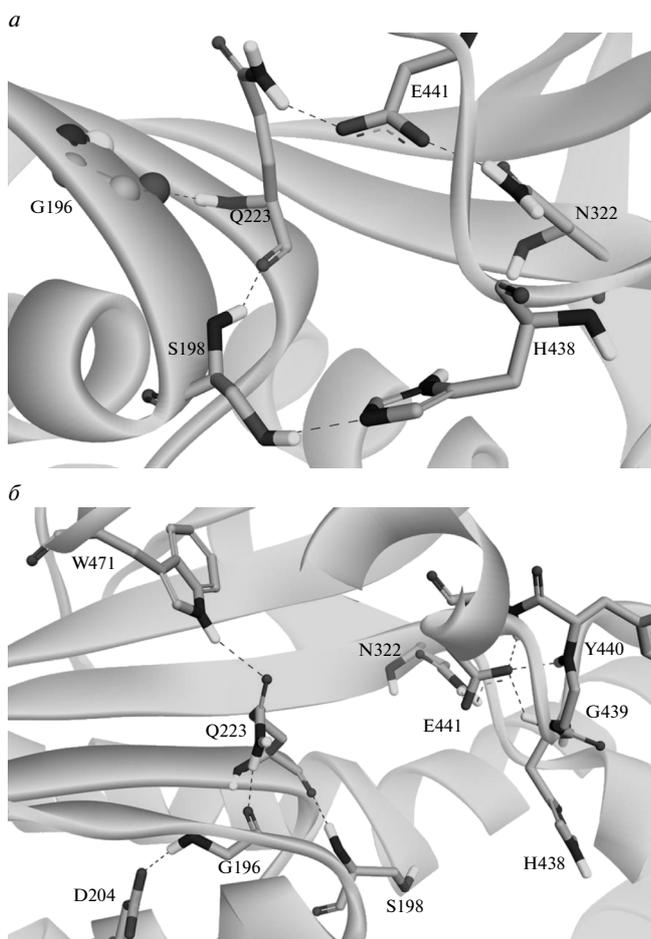


Рис. 4. Сетка водородных связей вокруг активного центра в обычной БХЭ (а) и мутанте Val204Asp (б) по результатам молекулярно-динамического моделирования (на рисунке приведены однобуквенные обозначения аминокислот)

стью. Физиологическая роль БХЭ до сих пор неизвестна.

Ген, кодирующий бутирилхолинэстеразу, отличается высоким полиморфизмом, идентифицировано уже 78 его вариантов. В 57 из них происходит потеря активности фермента (“молчащий фермент”), частично из-за проблем с экспрессией (стоп-кодон или сдвиг рамки считывания), частично из-за точечных замен в последовательности белка, сказывающихся на его каталитической активности. В обычной ситуации отсутствие активности БХЭ не приводит к проблемам со здоровьем у носителя модифицированного гена, но проявляется в виде повышенной чувствительности к различным химическим веществам — пестицидам и лекарственным препаратам. В частности, в клинической практике при применении в качестве миорелаксантов и анестетиков сукцинилхолина и мивакуриума снижение или отсут-

ствие активности БХЭ вызывает у пациента длительный паралич дыхательных мышц и даже остановку дыхания. Популяционные исследования показывают, что частота гетерозиготных мутаций БХЭ составляет примерно 1 на 160 человек, и один из 100 тыс. человек обладает полностью “молчащей” БХЭ. В 1958 г. была выявлена первая такая замена — Asp70Gly, а в 2013 г. обнаружены ещё две замены, приводящие к потере активности БХЭ, — Val204Asp и Ala34Val.

Asp70 расположен далеко от активного центра, однако детальное рассмотрение показало, что он участвует в связывании субстрата и замена его на нейтральную аминокислоту существенно снижает связывание и реакционную способность сукцинилхолина. В рамках КМ/ММ приближения был проведён полный анализ энергетических профилей действия БХЭ и выявлено влияние замены Asp70Gly на реакционную способность фермента [20]. При помощи молекулярно-динамического моделирования показано, как замены Val204Asp [21] и Ala34Val [22], находящиеся далеко от активного сайта за счёт изменения сетки водородных связей, приводят к разрушению каталитической триады и утрате ферментативной активности. В результате реагент в высоких концентрациях в течение длительного времени циркулирует в крови, вызывая мощный побочный токсический ответ.

В ходе молекулярного моделирования в структуре обычного варианта фермента, присутствующего у большинства людей, были проведены соответствующие аминокислотные замены и получены молекулярно-динамические траектории для трёх вариантов: обычного и мутантов Val204Asp и Ala34Val. Сравнение изменения основных характеристик структуры фермента вдоль молекулярно-динамической траектории показало, что две эти мутации оказывают различное влияние на структуру БХЭ, но в итоге приводят к распаду каталитической триады и утрате каталитической активности.

В случае мутации Val204Asp происходит перестройка сетки водородных связей, удерживающей вместе каталитические аминокислоты Ser198 и His438. В нормальном ферменте цепочку составляют аминокислоты Ser198, Gln223, Glu441 и Asn322, последовательно образуя водородные связи друг с другом, и, как показано на рисунке 4, а, удерживают на необходимом для протекания каталитической реакции расстоянии α/β изгиб, несущий Ser198 и петлю, несущую His438. Эта система стабильно поддерживается вдоль всей молекулярно-динамической траектории. Также важна водородная связь между пептидными группами Gly196 и Gln223, которая является одной из многих водородных связей, сшивающих структуру β -листа. Боковая цепь остатка Val204 не имеет функциональных групп и не участвует в специ-

ческих взаимодействиях. Замена валина на аспарагиновую кислоту приводит к появлению полярной и отрицательно заряженной функциональной группы, образующей новые взаимодействия с ближайшим аминокислотным остатком – Gly196 (рис. 4, б). В результате он разворачивается на 90° и выходит из плоскости β -листа, при этом сохраняя водородную связь с Gln223, но уже не с пептидной группой, а с боковой цепью. Новая водородная связь в свою очередь изменяет ориентацию Gln223, который вместо Glu441 образует водородную связь с Trp471. Эти новые водородные связи возникают очень быстро после начала молекулярно-динамического моделирования структуры БХЭ с внесённой точечной мутацией и поддерживаются на всём их протяжении, наблюдаются в серии независимых запусков. Разрыв водородной связи между Gln223 и Glu441 отпускает петлю, несущую Glu441 и His438, что через некоторое время за счёт тепловых движений разрушает контакт между каталитическими аминокислотами и приводит к увеличению внутреннего объёма и частичной денатурации фермента.

В случае мутации Ala34Val невозможно проследить за образованием новой сетки водородных связей. Наоборот, несколько независимых молекулярно-динамических запусков приводят к образованию новых контактов в ферменте, но неизменным остаётся разрушение каталитической триады. Аминокислота Ala34 расположена на поверхности фермента на расстоянии 32 \AA от активного сайта (рис. 5, а). Точечная мутация относительно незначительна: замена аланина на валин предполагает, что к боковой цепи добавится только одна $-\text{CH}_3$ группа. Однако этого оказывается достаточно, чтобы создать дополнительное трение в движении данного участка цепи, которое в нормальном ферменте протекает согласованно с остальной белковой молекулой. Лишняя $-\text{CH}_3$ группа выступает как металлический заусенец в механизме и постепенно увеличивает флуктуации цепи, которые передаются всё дальше, передаются внутрь канала, разрушая его структуру при существенном увеличении флуктуаций (рис. 5, б), а в итоге разрушая и каталитическую триаду. При этом аминокислотные остатки, выстилающие канал, хаотично образуют новые взаимодействия, которые быстро перестраиваются от траектории к траектории.

* * *

Приведённые примеры иллюстрируют потенциал вычислительной техники в изучении сложных механизмов взаимодействия белков с лигандами, выявлении и анализе индивидуальных проявлений макромолекулярного разнообразия, а также фундаментальных причин предрасположенности к заболеваниям и индивидуальной чувствительности к лекарствам. Полученные результа-

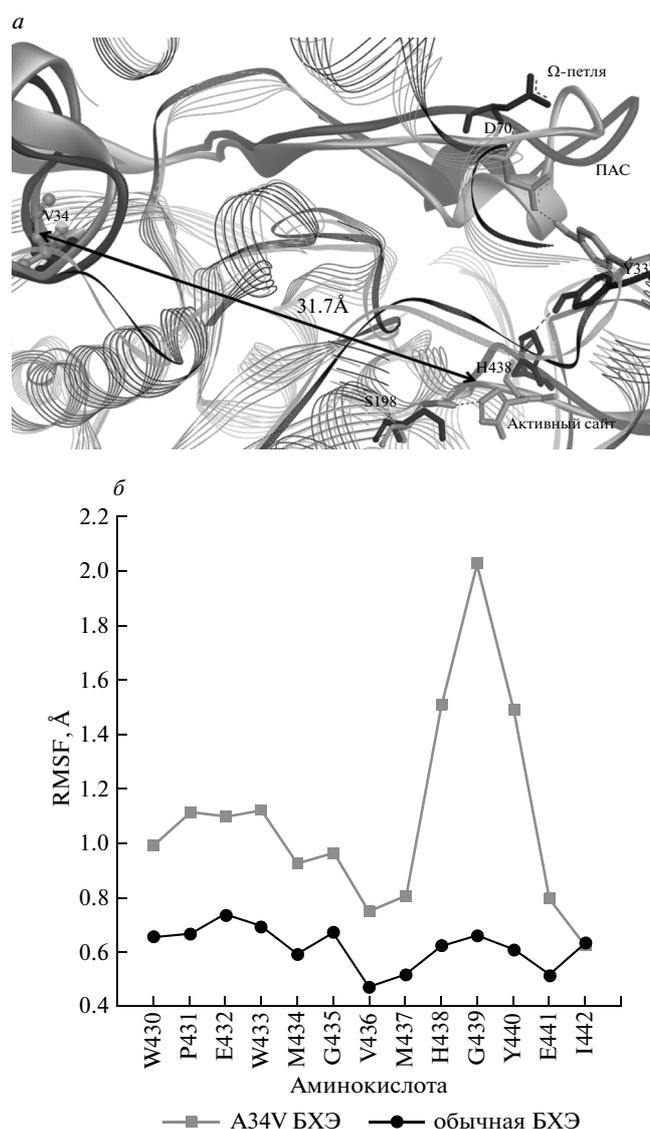


Рис. 5. Изменения, вызванные мутацией Ala34Val

Строение канала нативного фермента показано белым цветом, после динамики с мутацией – чёрным (а). Цепь, несущая Ala34, заходит внутрь канала, мутация Ala34Val приводит к постепенному увеличению флуктуаций аминокислот в канале, включая каталитические (б)

ты свидетельствуют о расширении возможностей направленного воздействия на метаболические процессы в организме человека, что определяется повышением уровня наших знаний о молекулярной природе “живого вещества” и впечатляющим прогрессом вычислительной техники. Представляется в высшей степени целесообразной разработка и последующее включение программы “Суперкомпьютерные технологии в молекулярной медицине и конструировании лекарств” в общую структуру программ фундаментальных исследований Президиума РАН. Этот междисциплинарный проект способен объединить исследователей в области медицины, биологии, химии, вычислительных технологий.

Работы по изучению взаимодействия ацетилхолинэстеразы с антимиастеническими препаратами выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках совместного комплексного проекта с Казанским научным центром (13-00-40286-К). Работы по полиморфизму ферментов человека выполнены при поддержке Российского научно-го фонда (14-13-00124). Выражаем благодарность сотрудникам Суперкомпьютерного центра МГУ им. М.В. Ломоносова и Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН за доступ к вычислительным ресурсам.

ЛИТЕРАТУРА

- Молекулярный полиморфизм человека. Структурное и функциональное индивидуальное разнообразие биомолекул / Под ред. С.Д. Варфоломеева. М.: Изд-во МГУ, 2007.
- Постгеномные исследования и технологии / Под ред. С.Д. Варфоломеева. М.: Макс Пресс, 2011.
- Molecular Polymorphism of Man / Eds. S. Varfolomeev, G. Zaikov. New York: Nova Science Publishers, 2011.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z. et al.* The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Research*. 2000. V. 28. P. 235–242.
- Kurova V.S., Kurochkin I.N., Kalamkarov G.R. et al.* Structural and catalytic polymorphism of human enzymes: Novel potential platforms for biomedical diagnostics // *Biotechnology Advances*. 2009. V. 27. P. 945–959.
- Kurova V.S., Anaev B.C., Kononikhin A.S. et al.* Proteomics of exhaled breath: methodological nuances and pitfalls // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2009. V. 47. P. 706–712.
- Kubinji N.* Success stories of computer-aided design // *Computer Applications in Pharmaceutical Research and Development* / Ed. S. Ekins, John Wiley and Sons, 2006. P. 377–422.
- Talate T., Khedbar S.A., Rigly A. C.* Successful Applications of Computer Aided Drug Discovery: Moving Drugs from Concept to the Clinic // *Current Topics in Med. Chem.* 2010. V. 10. P. 127–141.
- Monticelli L., Salonen E.* Biomolecular Simulations. Humana Press, 2013.
- Зайцев С.В., Ярыгин К.Н., Варфоломеев С.Д.* Нейропептид-морфиновые рецепторы. М.: Изд-во МГУ, 1993.
- Воеводин Вл.В., Жуматий С.А., Соболев С.И. и др.* Практика суперкомпьютера “Ломоносов” // *Открытые системы*. 2012. № 7. С. 36–39.
- Kharlamova A. D., Lushchekina S.V., Petrov K.A. et al.* Slow-binding inhibition of acetylcholinesterase by a 6-methyluracil alkyl ammonium derivative: mechanism and advantages for myasthenia gravis treatment // *Biochemical Journal* (in press).
- Masson P., Lushchekina S.* Slow-binding inhibition of cholinesterases, pharmacological and toxicological relevance // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016. V. 593. P. 60–68.
- Varfolomeev S.D.* Catalical sites of enzymes: structural paradoxes, the phenomena of structural unity and new reactions // *Mendeleev Comm.* 2004. V. 5. P. 185–189.
- Варфоломеев С.Д., Гариев И.А., Уноров И.В.* Каталитические центры гидролаз: структура и каталитический цикл // *Успехи химии*. 2005. Т. 74. С. 67–83.
- Физическая химия биопроцессов* // Под ред. С.Д. Варфоломеева. М.: URSS, 2013.
- Немухин А.В., Григоренко Б.Л., Луцкекина С.В., Варфоломеев С.Д.* Квантово-химическое моделирование в исследовании молекулярных механизмов действия ферментов // *Успехи химии*. 2012. Т. 81 (11). С. 1011–1025.
- Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Kolomeisky A.B., Nemukhin A.V.* Hydrolysis of Guanosine Triphosphate (GTP) by the Ras-GAP Protein Complex: Reaction Mechanism and Kinetic Scheme // *J. Phys. Chem. B. J. Phys. Chem. B*. 2015. V. 119. P. 12838–12845.
- Tsai G., Coyle J.T.* N-Acetylaspartate in neuropsychiatric disorders // *Progress in Neurobiology*. 1995. V. 46. P. 531–540.
- Луцкекина С.В., Григоренко Б.Л., Морозов Д.И. и др.* Моделирование механизма реакции гидролиза сукцинилхолина в активном сайте нативной и модифицированной (Asp70Gly) бутирилхолинэстеразы человека // *Известия РАН. Серия химическая*. 2010. № 1. P. 56–61.
- Delacour H., Lushchekina S., Mabboux I. et al.* Characterization of a Novel BCHE “Silent” Allele: Point Mutation (p.Val204Asp) Causes Loss of Activity and Prolonged Apnea with Suxamethonium // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e101552 (1-9).
- Delacour H., Lushchekina S., Mabboux I. et al.* Characterization of a novel butyrylcholinesterase point mutation (p.Ala34Val), “silent” with mivacurium // *Biochem. Pharmacol.* 2014. V. 92. P. 476–483.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ СТРАТЕГИЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН А.М. ДЫГАЯ

*Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга,
Томск, Россия*

e-mail: dygai_am@pharmso.ru

Поступил в редакцию 22.12.2015 г.

Одним из рациональных подходов к решению задач регенеративной медицины является фармакологическое управление функционированием эндогенных стволовых клеток, основанное на принципе подражания естественным регуляторным системам их функционирования в организме. Анализ данных, полученных на различных моделях патологических процессов, показал, что наблюдавшаяся в большинстве случаев активация костномозговых стволовых клеток оказывалась недостаточной для компенсации имеющихся повреждений. Несмотря на то, что гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и некоторые другие фармакологические агенты обладают самостоятельной специфической активностью в отношении прогениторных клеток различных классов, наиболее значимых терапевтических эффектов за счёт активации систем клеточного обновления удаётся добиться при их сочетанном использовании с иммобилизированной гиалуронидазой.

Ключевые слова: регенерация, стволовые клетки, регуляция, тканевое микроокружение, цитокины, цирроз печени, фиброз лёгких, гиалуронидаза, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, иммобилизация, полиэтиленгликоль, внутриклеточные сигнальные молекулы.

DOI: 10.7868/S0869587316060141

Прогресс биомедицины в последние десятилетия позволил существенно углубить наши знания в области биологии стволовых клеток (СК) [1–5]. Наиболее изученной их популяцией во взрослом организме, обладающей уникальной способностью к самоподдержанию, а в случае необходимости к миграции и хомингу в отдалённые органы с дальнейшей дифференцировкой в клетки различной специализации, сегодня является популяция мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга. В то же время в постнатальном периоде, то есть с момента рождения, в других органах также присутствуют элементы, обладающие высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом. Это региональные клетки-предшественники, основное назначение которых, как и МСК, — обеспечение регенерации тканей в ответ на физиологическую убыль клеток либо их гибель, вызванную повреждающим фактором [6, 7].

Полученные в последние годы сведения о свойствах и закономерностях жизнедеятельности стволовых клеток привели к появлению и развитию нового направления в лечении многих заболеваний — клеточной терапии, предполагающей

ДЫГАЙ Александр Михайлович — академик РАН, директор НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга.

трансплантацию клеток в больной организм с целью его лечения. Вместе с тем физиологичным и рациональным подходом к решению задач регенеративной медицины, по нашему мнению, является стимуляция функций эндогенных СК, основанная в том числе на принципе подражания деятельности естественных регуляторных систем их функционирования в организме [5, 6].

Анализ данных, полученных на различных моделях патологий (инфаркт миокарда, хронический гепатит, сахарный диабет, энцефалопатии различного генеза, кожная рана), показал во всех случаях развитие практически однотипных реакций со стороны прогениторных клеток (СК, детерминированных на дифференцировку в определённый тип клеток), что свидетельствует об их неспецифическом характере. Независимо от типа повреждений наблюдалась активация мультипотентных СК костного мозга, не сопровождавшаяся однако их мобилизацией в периферическую кровь. При этом повышение функциональной активности региональных клеток-предшественников органов-мишеней оказывалось недостаточным для компенсации вызываемых повреждений [6, 8, 9].

На начальном этапе наших исследований с целью активации данных механизмов было решено вводить препарат гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), который на про-

тяжении многих лет использовался для мобилизации клеток-предшественников, но только кроветворных. Г-КСФ во всех случаях обладал выраженным, хотя и в разной мере, терапевтическим эффектом. Механизмами его действия являлись стимуляция функциональной активности мультипотентных клеток-предшественников костного мозга, их мобилизация, миграция и, очевидно, хоминг в органы-мишени, что ускоряло течение репаративных процессов в повреждённых тканях [6, 9].

Помимо использования препарата Г-КСФ, была предпринята попытка управления функциями эндогенных СК путём модификации свойств межклеточного матрикса с помощью фермента гиалуронидазы. Относительно низкие её дозы существенно повышали функциональную активность как мезенхимальных, так и кроветворных клеток-предшественников. В то же время выраженная деградация гиалуроновой кислоты, вызывавшаяся увеличением дозы вводимого фермента, напротив, сопровождалась нарушением функционирования всех видов клеток-предшественников [10]. При изучении эффектов совместного применения гиалуронидазы и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора выявилось значительное усиление мобилизующего действия Г-КСФ в отношении прогениторных элементов (содержание МСК в периферической крови увеличивалось до 1000% от фона, что почти в 3 раза выше, чем при введении только Г-КСФ) [11].

Для оценки функциональной полноценности мобилизованных таким образом СК были проведены эксперименты, в которых изучалась сравнительная терапевтическая активность клеточного материала, представленного мононуклеарами периферической крови, после использования Г-КСФ в мобилизующем режиме и при совместном применении цитокина и гиалуронидазы на модели миелосупрессии (снижения содержания в крови лейкоцитов и тромбоцитов), вызванной 5-фторурацилом. В ходе работы показана значительно более высокая эффективность трансплантата, полученного после введения обоих препаратов. Механизмами, способствующими регенерации кроветворной ткани, служили не только увеличение пула кроветворных прекурсоров и возрастание их функциональной активности, но и восстановление гемопоэзинуцирующего микроокружения костного мозга, особенно его стромального компонента, что сопровождалось повышением числа стромальных предшественников и усилением продукции гемопоэтинов прилипающими миелокариоцитами. Вместе с тем необходимо отметить: белковая природа данных веществ определяет довольно высокую их токсичность, что закрывает путь к широкому практическому их применению в регенеративной медицине в тех случаях, когда предполагается длительное, многократ-

но повторяющимся курсами введение фармакологического агента.

Путь к принципиально новым лекарственным средствам открыло развитие нанотехнологий. На их основе удалось создать хорошо себя зарекомендовавшие в клинике конъюгированные с полимерами препараты, в том числе на основе белков (пегасис, пэгфилграстим, мирцера и др.). Они обладают большей стабильностью, растворимостью, более значительным периодом полувыведения из организма, чем их немодифицированные аналоги. Благодаря перекрытию полиэтиленгликолем (ПЭГ) антигенных детерминант белков данные препараты становятся ещё и практически невидимыми для элементов системы иммунного надзора, что делает их значительно менее токсичными. Однако для их получения применяется технология пэгилирования химического синтеза, которая, несмотря на её успешность, имеет и ряд существенных ограничений, связанных прежде всего с тем, что химический синтез конъюгатов — весьма сложный многоступенчатый и дорогостоящий производственный процесс. В то же время существует нанотехнология радиационного (электронно-лучевого) синтеза, также позволяющая выпускать практически нетоксичные и неиммунные белковые препараты. Кроме того, данные вещества в значительной степени защищены от протеолитических ферментов, что делает возможным их эффективное пероральное использование.

С учётом вышеизложенных подходов нами совместно с Группой компаний “СФМ” (Новосибирская область) были разработаны нанотехнологические модификаторы функций стволовых клеток. В отличие от веществ, получаемых путём химического пэгилирования (где на молекулу белка приходится молекула полиэтиленгликоля), в структурах, полученных нами с помощью электронно-лучевого синтеза, образуются мицеллы, крупные частицы, в которых молекулы ПЭГ обращены наружу гидрофильными концами. В результате на поверхности этих частиц формируется водная оболочка, во многом определяющая их биологические свойства.

При изучении фармакологических свойств иммобилизованного на полиэтиленгликоле гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (имГ-КСФ) было показано наличие в ряде случаев более выраженных, чем у стандартных препаратов, свойств, стимулирующих гранулоцитопоз. Однако наиболее важной фармакологической особенностью имГ-КСФ оказалась уникальность механизмов его действия. В частности, стимуляция процессов кроветворения под влиянием имГ-КСФ, в отличие от таковой при использовании неконъюгированного аналога, происходит в большей степени за счёт активации “срочных” механизмов компенсации в результате

воздействия препарата на коммитированные клетки-предшественники. При этом максимально снижается риск возможного истощения “глубокого резерва” регенерации костного мозга — полипотентных кроветворных клеток и, как следствие, срыва процесса адаптации. Также происходит быстрое морфофункциональное восстановление гемопозиндуцирующего микроокружения, повреждённого цитостатическими агентами, с последующим усилением фидерных свойств стромальных миелокариоцитов в отношении кроветворных клеток-предшественников [12].

Кроме того, особый интерес для регенеративной медицины представляют свойства нашего препарата, способствующие мобилизации прогениторных клеток. Было обнаружено, что процесс пэгилирования цитокина с использованием технологии электронно-лучевого синтеза сопровождается повышением эффективности стимуляции выхода в кровь наиболее ранних родоначальных элементов, клеток, обладающих максимально высоким ростовым потенциалом. Данный феномен связан с изменением функционирования стромальных клеток микроокружения тканей-депо СК и в первую очередь костного мозга: снижением продукции ими основного хемокина — SDF-1-фактора. Указанные изменения в случае введения препарата на фоне смоделированного хронического токсического гепатита сопровождались миграцией рекрутированных стволовых клеток в повреждённую печень, что приводило к развитию антисклеротического и антихолестатического эффектов [13].

Однако более перспективным препаратом для регенеративной медицины, на наш взгляд, является созданный с помощью данной технологии препарат иммобилизированной гиалуронидазы (имГД). Разработанным средством обладает выраженным резорбтивным (после вливания в кровь) действием. Кроме того, сегодня не известны другие вещества, оказывающие столь же выраженное влияние одновременно на такое количество функций прогениторных элементов и механизмы их регуляции.

Стимуляция имГД пролиферации родоначальных мезенхимальных клеток на модели хронического токсического гепатита сопровождается ещё и стимуляцией выхода их в кровь, а также выраженной детерминированной миграцией в органы-мишени. Указанные реакции развиваются на фоне резкого снижения выработки SDF-1-фактора стромальными клетками костного мозга (более значительного, чем даже при использовании Г-КСФ) на фоне, напротив, значительного усиления продукции всё того же SDF-1-фактора элементами микроокружения печени и повышения способности самих клеток-предшественников к адгезии. Развитие описанных феноменов со стороны родоначальных клеток сопровождается и

выраженными терапевтическими эффектами. Так, пятикратное введение препарата крысам в дозе 50 ед./кг после месячного введения тетра-хлорурглера, являющегося сильным токсикантом, приводит практически к полной нормализации морфофункционального состояния печени [14, 15].

Таким образом, применение имГД приводит к выраженной стимуляции процессов пролиферации и дифференцировки как регионарных стволовых клеток различных органов, так и прогениторных элементов их тканей-депо. Причём активация последних сопровождается ещё и их мобилизацией и направленной миграцией в органы-мишени. Кроме того, данное средство, очевидно, за счёт модификации состояния гликокаликса (гликопротеидного комплекса, ассоциированного с наружной поверхностью плазматической мембраны клетки) и рецепторов к биологически активным веществам клеток-предшественников, изменяет их восприимчивость к регуляторным стимулам [16].

Более того, потенцирующее влияние имГД выявлено и в отношении синтетических фармакологических агентов, в частности, нейротропных веществ. Данные результаты были получены на модели блеомицинового фиброза лёгких. При этом происходила стимуляция костномозговых гемопозитических стволовых и прогениторных клеток с последующей миграцией в повреждённую цитостатическим препаратом блеомицином ткань лёгкого. В период синтеза и отложения коллагеновых волокон в лёгких мышцей, получавших блеомицин, расширялся пул мезенхимальных стволовых клеток. В этих условиях препарат спиперон (антагонист дофаминовых D₂-рецепторов и рецепторов некоторых других видов) снижал содержание предшественников фиброзной ткани в лёгких. Дополнительное введение гиалуронидазы усиливало данный эффект [17, 18].

Антифибротическое действие гиалуронидазы при пневмофиброзе наиболее выражено при использовании её в виде конъюгата с плуроником. Причём интраназальное введение полноксамер-гиалуронат—эндо—N-ацетилгексоза-минидазы препятствует развитию блеомицин-индуцированного фиброза лёгких при введении мышам как в профилактическом, так и терапевтическом режиме [19].

Наши исследования фенотипических характеристик прогениторных клеток показали, что роль клеток-предшественников различных классов в развитии и приостановке отдельных патологических процессов неодинакова. Таким образом, несмотря на то, что имГ-КСФ и некоторые другие фармакологические агенты обладают самостоятельной специфической активностью в отношении прогениторных клеток различных классов, воздействуя и на глубокий резерв компенсации —

стволовые клетки тканей-депо, всё же наиболее значимых терапевтических эффектов за счёт активации систем клеточного обновления удаётся добиться при использовании этих агентов в сочетании с имГД. Представленные данные свидетельствуют о высокой перспективности применения в регенеративной медицине фармакологических агентов – модификаторов функций прогениторных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М., Дубровина И.В. Мезенхимальные стволовые клетки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. № 2. С. 124–131.
2. Kang S.K., Lee D.H., Bae Y.C. et al. Improvement of neurological deficit by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats // Exp. Neurol. 2003. V. 183. P. 355–366.
3. Yannaki E., Athanasiou E., Xagorari A. et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs // Exp. Hematol. 2005. V. 33. P. 108–119.
4. Репин В.С. Клеточной биологии – 100 лет: уроки на будущее // Гены и клетки. 2007. № 3. С. 9–17.
5. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. Регенеративная медицина: в поисках “эликсира жизни” // Наука из первых рук. 2013. № 3. С. 25–31.
6. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Современные взгляды на проблему стволовых клеток и возможности их использования в медицине // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. № 4. С. 184–189.
7. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др. Участие мезенхимальных клеток-предшественников в заживлении ран на модели кожного лоскута // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 3. С. 132–134.
8. Ермакова Н.Н., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др. Механизмы изменений систем клеточного обновления при экспериментальном сахарном диабете // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. 2007. № 6. С. 72–77.
9. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др. Фармакологические аспекты регенеративной медицины // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008, приложение № 2. С. 14–20.
10. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Регуляция функций прогениторных клеток с помощью гиалуронидазы // Вестник РАМН. 2009. № 11. С. 6–9.
11. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. Механизмы мобилизации мезенхимальных клеток-предшественников гранулоцитарным колониестимулирующим фактором и гиалуронидазой // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2007. № 12. С. 652–656.
12. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Фармакологические свойства пегилированного с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 3. С. 146–150.
13. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Мобилизация стволовых клеток пегилированным с помощью нанотехнологии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором как модель изучения процессов миграции прогениторных элементов // Биомедицина. 2010. № 1. С. 17–23.
14. Дыгай А.М., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н. и др. Механизмы гепатопротективного действия иммобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. № 10. С. 371–375.
15. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Гепатопротекторные эффекты иммобилизованной с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидазы и механизмы их развития // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. № 1. С. 86–90.
16. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Влияние иммобилизованной с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гиалуронидазы на чувствительность прогениторных клеток к регуляторным факторам // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 1. С. 47–50.
17. Skurikhin E.G., Pershina O.V., Reztsova A.M. et al. Modulation of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis by Pegylated Hyaluronidase and Dopamine Receptor Antagonist in Mice // PLoS ONE. 2015. V. 10(4). P. 1–24.
18. Skurikhin E.G., Pershina O.V., Khmelevskaya E.S. et al. Modulation of Stem and Progenitor Cells and Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis by Spiperone in Mice // J. Stem Cell Res. Ther. 2014. V. 4. P. 210–234.
19. Скурихин Е.Г., Резцова А.М., Ермакова Н.Н. и др. Антифибротическая активность конъюгатов на основе амфифильного плуроника F68 и гидрофобного плуроника L31 с гиалуронат-эндо-β-N-ацетилгексоза-минидазой при фиброзе лёгкого // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. № 1. С. 9–13.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН В СООТВЕТСТВИИ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПРОФИЛЕМ НАСЕЛЕНИЯ

© 2016 г. *ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН Г.Г. ОНИЩЕНКО,
АКАДЕМИКА РАН О.И. КИСЕЛЁВА*

e-mail: taruntaeva_na@aprt.gov.ru

Поступил в редакцию 20.01.2016 г.

Изменчивость вирусов в значительной степени зависит от адаптации к условиям репродукции и механизмам противовирусной защиты клеток хозяина. В рамках популяций адаптация связана с особенностями типа HLA, определяющими специфичность распознавания вирусных антигенов. Генетический профиль популяции и разнообразие гаплотипов HLA влияют не только на уровень заболеваемости, но и на судьбу целых этнических групп, их численность и показатели преждевременной смертности. Поэтому решение проблемы эффективности защиты населения от массовых вирусных инфекций невозможно без учёта межэтнического полиморфизма HLA, определяющего чувствительность к инфекциям и реакцию на массовую вакцинацию. Современные достижения генетики человека позволяют последовательно выводить систему профилактической медицины на уровень генетической персонализации. В такой многонациональной стране, как Россия, данный подход должен стать основой профилактического направления практической медицины.

Ключевые слова: противогриппозные вакцины, генетический профиль населения, группы повышенного риска, “дополнительная смертность”, пути распространения основных штампов вируса, гены, мутации, полиморфизм.

DOI: 10.7868/S0869587316060293

Смертность от гриппа среди групп повышенного риска. Вакцинация против гриппа прежде всего призвана снизить смертность от этого заболевания. В первую очередь она адресована возрастным группам риска (детям и пожилым людям), а также пациентам с хроническими болезнями, обострение течения которых при гриппе может привести к фатальному исходу. В острый период эпидемий и пандемий гриппа смертность вызвана преимущественно развитием тяжёлых вирусных или вирусно-бактериальных пневмоний. Кроме того, наблюдается так называемая “дополнительная” смертность, которая особенно высока в осенне-зимний период [1].

Среди групп риска тяжёлых исходов заболевания гриппом – лица с заболеваниями органов дыхания, сердечно-сосудистыми заболеваниями, новообразованиями и предрасположенные к развитию инсультов и инфарктов миокарда [1, 2]. По международной статистике, показатели смертности от гриппа увеличиваются за счёт пациентов с различными формами диабета и метаболическим синдромом (в первую очередь ожирение и

излишний вес), онкологической патологией [2]. Существует прямая связь между осложнённым гриппом и развитием тромбозов [3, 4], а следовательно, возникновением инсультов и инфарктов миокарда. По данным ВОЗ, вакцинация против гриппа целевых групп населения с хроническими заболеваниями позволяет добиться значительного снижения смертности и отягощения течения основного заболевания (табл. 1) [5, 6].

В таблице 1 представлены группы риска по основным видам соматических заболеваний, заражение гриппом которых чревато тяжёлыми осложнениями или фатальным исходом. В данном случае активная иммунизация позволит значительно снизить смертность от гриппа. Что касается основной популяции населения, то здесь нужны другие критерии. В первую очередь необходимо осуществлять контроль над теми группами, которые предрасположены к тяжёлому течению острых респираторных вирусных инфекций, и проводить среди них вакцинопрофилактику.

На основе многолетнего системного анализа прослеживаются пути заноса инфекции на территорию Российской Федерации. Для страны таких масштабов, как наша, целый ряд регионов которой географически и экологически может быть отнесён к “коридорам” проникновения инфек-

ОНИЩЕНКО Геннадий Григорьевич – академик РАН, КИСЕЛЁВ Олег Иванович – академик РАН, Институт гриппа, Санкт-Петербург.

Таблица 1. Классификатор групп риска и исходы заболевания гриппом

Сопутствующие хронические заболевания и причина смертности от гриппа	
Хронические заболевания лёгких (включая бронхиальную астму)	Высокая вероятность тяжёлых осложнений, включая острый респираторный дистресс-синдром и отёк лёгких: вакцинация приводит к снижению обострений хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ); вакцинация высокоэффективна в профилактике острых респираторных заболеваний у лиц с ХОБЛ; вакцинация снижает риск развития осложнений и обострения бронхиальной астмы; вакцинация снижает риск смертельных исходов от кистозного фиброза лёгких — муковисцидоза
Диабет 1-го и 2-го типа	Обострение течения диабета, развитие системного поражения сосудов, эндотелиальная дисфункция, тромбоз, лёгочный дистресс-синдром и отёк лёгких: вакцинация снижает число госпитализированных больных в течение эпидемий и пандемий до 79%, что соответствует уровню предупреждения развития тяжёлых осложнений гриппозной инфекции у больных диабетом
Болезни сердца	Острая сердечная недостаточность, обострение хронической сердечной недостаточности, острый респираторный дистресс-синдром, отёк лёгких. Отсроченные осложнения — тромбоз, инфаркт миокарда, инсульт: вакцинация снижает на 20–70% сердечно-сосудистые осложнения гриппозной инфекции
Иммуносупрессивные состояния и ВИЧ/СПИД	Высокая вероятность развития сепсиса и септических состояний, пневмонии и отёка лёгких: вакцинация снижает уровень заболеваемости гриппом ВИЧ-больных
Хронические заболевания почек	Развитие острой почечной недостаточности, системная эндотелиальная дисфункция, лёгочный дистресс-синдром: вакцинация снижает риск развития осложнений, частоту госпитализации и смертельных исходов
Неврологические заболевания, включая нейромышечные, эпилепсию и т.д.	Нарушения мозгового кровообращения, инсульты, эпилептические судороги, эпилептический статус: вакцинация рекомендована основным категориям больных с неврологическими заболеваниями
Другие группы пациентов	
Этнические группы	Тяжёлое течение заболевания и высокая смертность среди определённых групп по типу HLA: вакцинация снижает смертность; вакцины должны быть адаптированы к определённым гаплотипам HLA
Беременные женщины	Прерывание беременности на всех сроках, развитие гипоксии плода, на ранних сроках — врождённые дефекты плода, высокая смертность как матери, так и плода: вакцинация рекомендована на всех сроках беременности, предотвращает развитие осложнений
Люди старше 65 лет	Высокая смертность от пневмоний и сердечно-сосудистых осложнений, включая острый респираторный дистресс-синдром, отёк лёгких; отсроченные причины смертности — тромбоз, инсульт, инфаркт миокарда: вакцинация снижает на 27% частоту госпитализаций и смертность на 48%

ции, использование соответствующих знаний играет важную роль в деле “управления” эпидемическими процессами. В этих регионах возможно проведение “баррикадной” или “барьерной” вакцинации, на чём давно настаивают ведущие специалисты в области гриппа. Подобные противоэпидемические мероприятия призваны ослабить первую волну эпидемии или пандемии.

География опорных баз Федерального центра по гриппу при ФГБУ “НИИ гриппа” Минздрава России, которые являются профильными лабораториями региональных центров Роспотребнадзора РФ, очень широка, особенно в Европейской части России. Информация по заболеваемости гриппом и вирусные изоляты поступают в эти лаборатории, что позволяет проводить еженедель-

ный мониторинг развития эпидемии гриппа на всей территории страны [7].

Система надзора за гриппом совершенствовалась годами, и в настоящее время её организация в нашей стране считается лучшей в мире. На рисунке 1 показаны пути распространения гриппа в 2015 г. (эпидемия началась в январе), по данным опорных баз.

Вопрос о том, связаны ли маршруты заноса ежегодных эпидемий гриппа с генетическими особенностями популяций, населяющих соответствующие районы Российской Федерации, требует тщательного изучения. На наш взгляд, такую связь исключить нельзя.

Среди географических кластеров — Северо-Западный (Калининград, Санкт-Петербург, Мур-

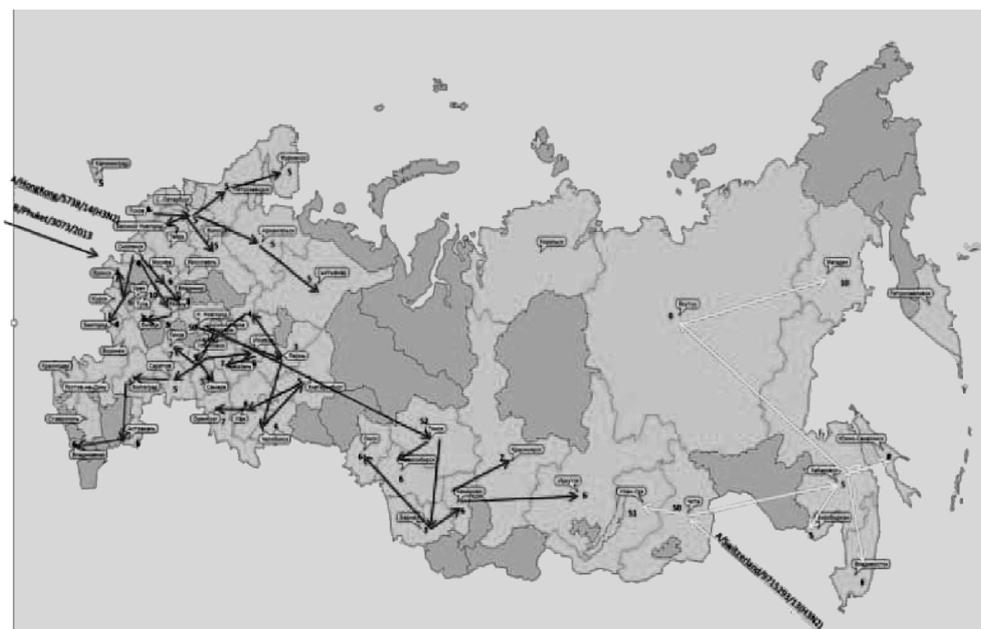


Рис. 1. Пути распространения основных штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и В по территории России во время эпидемии 2015 г.

манск, Архангельск), города Центральной России (в первую очередь Москва), города Поволжья, Среднего и Южного Урала, Сибири, Алтайского края, на Дальнем Востоке – Чита, Хабаровск, Владивосток и Южно-Сахалинск (см. рис. 1). Такое географическое распределение надзора позволяет получать точную информацию о заболеваемости гриппом по крупным и средним городам кластеров и проследить динамику распространения гриппа на региональном и глобальном уровнях [7].

Типичные пути распространения эпидемий на территории Российской Федерации обозначены на рисунке 2. Для сезонных эпидемий характерны два типа входных “ворот” эпидемического заноса инфекции: европейские и дальневосточные. Массовое распространение инфекции в двух противоположных по географической локализации регионах вряд ли прямо связано с особенностями региональных этнических групп. Для объективной оценки следует использовать более конкретный критерий, например, частоту госпитализаций по диагнозу “грипп”, позволяющий опреде-



Последовательность вовлечения городов в эпидемию
 ● первая очередь; ● вторая очередь; ○ третья очередь

Рис. 2. Типичные пути распространения эпидемий гриппа на территории Российской Федерации в 2000-е годы

Таблица 2. Гены, мутации и полиморфизм которых приводят к осложнённому течению гриппозной инфекции

Ген	Функция	Дефект
IFITM3	Фактор противовирусной защиты на уровне эндосом	Дефект внутриклеточной противовирусной защиты на раннем этапе инфекции (эндосомы)
Сурфактантный белок В	Лёгочный сурфактант	Защита пневмоцитов, стабильность альвеол, транспорт кислорода и клиренс вирусов и бактерий
FCGR2A	Fc-рецептор – фактор клиренса инфекционного вируса	Дефект клиренса вируса
C1QBP	Фактор системы комплемента	Дефект системы комплемента и комплемент-зависимого цитолиза инфицированных клеток
DAF/CD55	Фактор ускорения распада комплемента, антиген системы групп крови Кромера	Дефект врождённых механизмов защиты лёгких от комплемент-опосредованного поражения при гриппозной инфекции
MBL2	Клеточный лектин	Дефект регуляции врождённого иммунитета
SOCS4	Супрессор цитокин-зависимых сигнальных систем	Дефект контроля синтеза и активности цитокинов (возможно развитие “цитокинового шторма”)
SECISBP2	Комплекс Se-зависимых ферментов	Дефект антиоксидантной системы

Источник: [10, 11].

лить число осложнённых и тяжело протекающих клинических форм гриппа. Кроме того, важна оценка смертности в палатах интенсивной терапии. В отдельных странах смертность от гриппа в период пандемического гриппа H1N1pdm09 в палатах интенсивной терапии достигала 40% [2–6]. Во всех сводках и аналитических докладах по пандемии гриппа 2009–2011 гг. в Европе, Китае и США приводится этнический состав заболевших и умерших от гриппа [2, 8, 9]. Обязательны также данные по сопутствующей патологии (от болезней лёгких до диабета и т.д.). Тем самым можно реально оценить вклад в эпидемический процесс отдельных групп населения с точки зрения этнического состава, тяжести течения заболевания и хронической патологии.

Переход от массовых статистических показателей к показателям более узкого спектра сопряжён с серьёзными трудностями. Вместе с тем исследование в области генетики популяций, связь типов HLA и генов, определяющих уровень генетически детерминированной чувствительности или устойчивости к гриппу, свидетельствуют, что их влияние существенно не только в период гриппозных пандемий, но и в системном возврате сезонных эпидемий [10, 11].

Полиморфизм генов, вносящих дополнительный вклад в тяжёлое течение гриппозной инфекции. Исследование полиморфизма генов для выяснения предрасположенности к инфекционным заболеваниям и их тяжёлому течению имеет фундаментальное значение в педиатрической практике и изучении глобальных эпидемических процессов

[1, 4, 5]. Профиль генов, в той или иной степени определяющих развитие осложнений гриппа, с годами существенно расширяется [4, 5]. В таблице 2 представлен перечень этих генов и их вероятный вклад в нарушение тех или иных функций в эрадикации гриппозной и других вирусных инфекций.

Особый интерес представляет полиморфизм в генах человека, определяющих систему первичной (неспецифической) защиты от патогенных вирусов [10]. В этом отношении большое значение придаётся мутациям в генах системы противовирусной защиты (IFITM3), лёгочного сурфактанта (сурфактантный белок В), Fc-рецептора (FCGR2A), системы комплемента (C1QBP) и таких факторов неспецифической защиты, как клеточный лектин (MBL2). “Цитокиновый шторм”, вызывающий системную органную недостаточность, может развиваться у пациентов с мутациями в гене SOCS4. Существенным для тяжёлого развития гриппозной инфекции является полиморфизм генов SECISBP2, кодирующих антиоксидантные Se-зависимые ферменты. Распространение и частота мутаций в перечисленных генах могут соответствовать числу госпитализированных пациентов и коррелировать со смертельными исходами заболевания [10, 12]. Мутация в гене IFITM3, кодирующем трансмембранный белок 3, индуцируемый интерфероном, широко распространена среди населения Китая и детерминирует высокую чувствительность ко многим вирусным инфекциям [11].

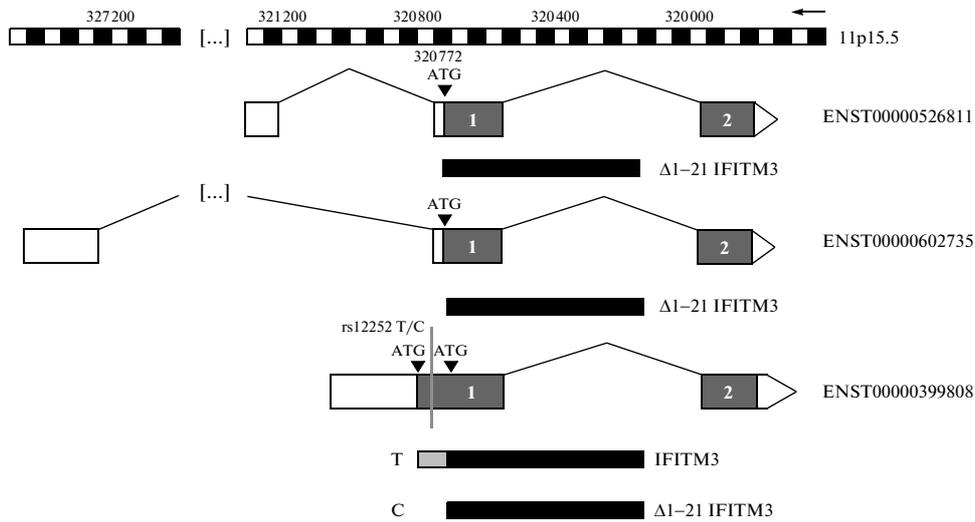


Рис. 3. Структура гена IFITM3, основные кодирующие транскрипты и их белковые продукты

Мутация, приводящая к образованию альтернативного сайта сплайсинга в экзоне 1, обозначена вертикальной чертой (однонуклеотидный полиморфизм rs12252 T/C). Чёрными треугольниками (рис. 3) отмечены старт-кодоны, чёрными прямоугольниками – белок-кодирующие экзоны гена *IFITM3*, заштрихован – фрагмент 1-21 белка IFITM3 [13].

На рисунке 4 серым цветом выделена N-концевая последовательность 1-MNHTVQTFSPVNS-GQPPNYE-21, отсутствующая в укороченной форме белка [10, 14]. Частота этой мутации в Китае превышает 60% [11]. Ранее предполагалось, что на территории этой страны существуют определённые экологические условия для формирования пандемических вирусов гриппа. Было доказано, что быстрая изменчивость вирусов гриппа в Китае связана с распространением вирусов по путям миграции птиц и с масштабным разведением домашней утки. Сегодня можно утверждать, что генетические особенности населения Китая также способствуют быстрому преодолению межвидовых барьеров и распространению вирусов птиц среди той части жителей, которая несёт генетические признаки высокой чувствительности к этой инфекции.

Таким образом, полиморфизм гена IFITM3 может существенно влиять на развитие глобальных пандемий гриппа. Следует также учитывать, что на Дальнем Востоке целый ряд этнических групп являются вероятными носителями мутации в гене IFITM3. Выявление такой генетической связи с ближайшими по географическому расположению группами населения позволит объяснить постоянство дальневосточных “ворот” заноса эпидемий и пандемий гриппа на территорию Российской Федерации.

В современной терапии гриппа распространённость генетической предрасположенности к гриппу и другим респираторным инфекциям не принимается во внимание. Между тем исследовались [14, 15]. В частности, практически для всех видов патологии человека установлена связь с определёнными аллелями HLA [15–21], иными словами, между генетической конституцией и предрасположенностью к тем или иным заболеваниям, особенно к аутоиммунным и инфекционным. Применительно к инфекционной патологии речь идёт о высокой чувствительности к данной инфекции, генетически детерминированной устойчивости к ней, генетически детерминированном тяжёлом течении заболевания, а также о том, что инфекционный агент может вызвать системное аутоиммунное заболевание [10, 15–22].

HLA-рестрицированная презентация вакцинальных антигенов как фактор снижения эффективности массовой вакцинации. Будучи массовой и плохо контролируемой инфекцией, в период сезонных эпидемий или пандемий грипп поражает миллионы людей с различным уровнем здоровья

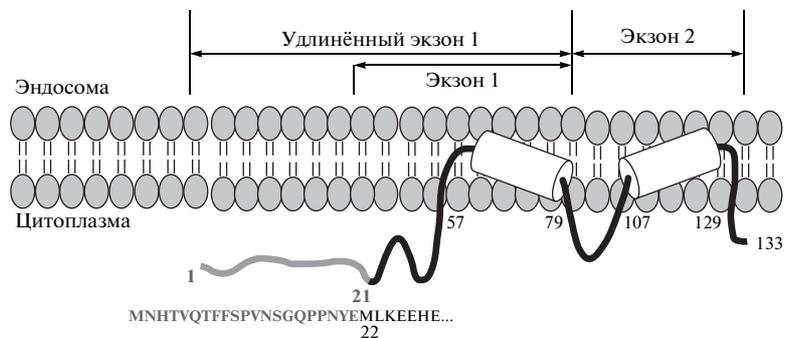


Рис. 4. Схема белка IFITM3

и генетической предрасположенностью к тяжёлым исходам болезни [10, 11]. Роль этой инфекции в селективном давлении на популяции населения изучена недостаточно. Академик Р.М. Хаитов с соавторами, рассмотрев проблему межэтнического полиморфизма [15], пришёл к выводу, что полиморфизм HLA ограничивается 5–10% диапазона известных специфичностей. Более того, при сравнении с европеоидами во многих этнических группах монголоидного происхождения число отдельных специфичностей HLA составляет 1% и ниже, поэтому различия с европейской популяцией выше в 10 и более раз. Делается правомочный вывод, что решающее значение в судьбе отдельных этнических групп или даже народов имеет уровень популяционного полиморфизма HLA [6, 7], основным показателем которого является количество специфичностей в той или иной популяции населения. Для отдельных этнических групп в Европе и Южной Америке характерно сильное снижение уровня полиморфизма специфичностей HLA [20, 21]. Естественно, в этих популяциях преобладает тенденция к повышению частоты гомозигот HLA. Ограничение спектра HLA резко уменьшает потенциал противoinфекционной защиты данных групп посредством снижения спектра и качества распознавания антигенов. Генетический профиль населения оказывается важным показателем, позволяющим прогнозировать устойчивое распространение инфекций среди тех или иных категорий и национальностей и спланировать профилактические мероприятия [20, 21].

Подобные закономерности характеризуют и массовые вакцинации: высокая индивидуальность иммунного ответа в отдельных этнических группах часто приводит к слабому иммунному ответу (или отсутствию такового) на протективные детерминанты вирусных белков, а также и распознаванию антигенных детерминант, способствующему выработке антител, которые перекрёстно реагируют на вирусные и клеточные белки, вследствие чего развивается аутоиммунная патология [22].

Таким образом, эта область практической вакцинологии предполагает не только контроль эффективности вакцинации, но и безопасности вакцинных препаратов массового применения.

Конструирование вакцин с учётом особенностей полиморфизма HLA [23] существенно повышает эффективность вакцинопрофилактики, что становится стимулом введения в практику эпипопных вакцин [24], адаптированных к популяциям с высоким уровнем гомозиготности. В первую очередь это относится к таким географическим регионам, как Крайний Север, юг Сибири, Приморье, Алтай, Забайкалье, Якутия. Центральная часть России по распределению типов HLA близка к населению Восточной Европы, а на восток от

Сибири наблюдаются резкие изменения типов и их сочетаний, а также нарастание гомозиготности по этому признаку по сравнению с центральными районами России.

В ходе исследования НДФ среди эскимосов, населяющих Аляску, в пределах этих групп установлен ограниченный полиморфизм локусов HLA-A и B. Для них были характерны только 35% специфичностей локуса A и 37% специфичностей локуса B. С высокой частотой встречались локусы A2, A24 и A28. Для локуса B частота встречающихся специфичностей составляла B51(5), B27, B35, Bw60(40), Bw61(40) и Bw62(15). Высокая частота антигенов Cw3 (75–69%) и DR4 (81–67%) также была характерна для исследованных групп. Обращает на себя внимание высокий уровень гомозиготности по отдельным специфичностям HLA. В одной из групп наблюдалось значительное преобладание локуса A*24, что соответствует высокой чувствительности к гриппозной инфекции.

Детальный анализ связи инфекционной патологии с генетической структурой популяций проведён в работах академика Р.М. Хаитова с сотрудниками [15]. Необходимость такого подхода подтверждается глобальными исследованиями эффективности презентации вирусных антигенов [7, 8] как фактора чувствительности или устойчивости к гриппозной инфекции.

Соотношение показателей смертности от пандемического гриппа (число случаев на 1 млн. населения) и частоты аллелей HLA-A*24 в 34 странах мира свидетельствует, что частота смертельных исходов прямо коррелирует с частотой распределения A*24 ($r = 0.37$, $P = 0.031$). В отношении вирусов гриппа H1N1pdm09 также получена положительная корреляция с частотой распределения HLA-A*68:01, но не HLA-A*68:02.

Среди аборигенов Австралии и Новой Зеландии выявлено необычное превалирование аллелей A*24 и превышение смертности в 3–8 раз. Превышение показателей смертности в этих этнических группах отмечалось и в период пандемии 1918–1919 гг. – 8.5% при общем показателе 2.5% [19].

Авторы работ [20, 21] считают, что проведённый ими анализ по 95 аллелям HLA-A и HLA-B позволяет с точки зрения фундаментальной иммунологии и иммуногенетики предсказать эволюцию вирусов гриппа типа A в пределах продолжительных периодов. Эволюционная устойчивость и длительная циркуляция вирусов гриппа типа A в значительной степени связаны с генетическими особенностями популяций, отличающихся высокой чувствительностью к этому типу инфекционных агентов.

Следует также отметить, что для достаточно распространённого аллеля HLA-A*32 в отношении вирусов H1N1pdm09 получена негативная

корреляция с показателями смертности. Для этой популяции характерны умеренное течение заболевания и низкая частота тяжёлых случаев с летальными осложнениями.

Таким образом, чтобы понять, какова реальная картина влияния эпидемий и пандемий гриппа на здоровье людей, необходимо учитывать как распространённость полиморфизма по генам устойчивости к инфекционным агентам, так и генетическую структуру всего населения, особенно тех этнических групп, которые являются носителями аллелей HLA, имеющих ограниченный спектр и низкий когнитивный уровень распознавания и презентации вирусных антигенов [20, 21].

Сбережение населения России в первую очередь должно быть основано на понимании его генетического разнообразия и формировании стратегии профилактического здравоохранения на пути развития персонализированной медицины в пределах основных и менее представительных этнических групп. Такой подход усиливает ответственность региональных органов здравоохранения и даёт возможность значительно повысить потенциал отечественной профилактической медицины.

В рамках обсуждаемой проблемы возникает много вопросов не только относительно эффективности массовой вакцинации и её региональной персонализации. Один из таких вопросов – генетическая безопасность вакцин. Особенности индивидуальной реакции на вакцинацию могут стать причиной негативных последствий. С итогами пандемии связан аутоиммунный ответ на вакцинацию некоторыми пандемическими вакцинами на основе вируса H1N1pdm09 [23] из-за широкого представительства в отдельных регионах страны групп населения с определённым гаплотипом HLA II антигенов.

Индивидуальная реакция на вакцинацию может привести к тяжёлым последствиям. Примером может служить распространение нарколепсии в результате вакцинации пандемической вакциной Пандемрикс (Глаксо СК) в Европе. Когда в период пандемии свиного гриппа H1N1pdm-2009 во всём мире была проведена массовая вакцинация, в ряде европейских стран в качестве поствакцинального побочного явления была установлена необычайно высокая частота развития нарколепсии (нарколепсии/катаlepsии), чаще всего осложнения фиксировались в Финляндии [23, 24]. Речь идёт о тяжёлом нейropsychическом заболевании, которое проявляется в нарушении сна в виде приступов сонливости. Их число может достигать до 40 в день. Этот вид патологии сна сцеплен с гаплотипом HLA-DQB1*06:02 и ассоциирован с нарушением регуляции гипокретиновых/орексिनорных рецепторов 2-го типа. Сравнительный анализ выворотов от пациентов с нарколепсией, развившейся в поствакцинальный период, показал, что она прямо связана с вакциной Пандемрикс [23]. Детальное изучение показало, что “роковой”

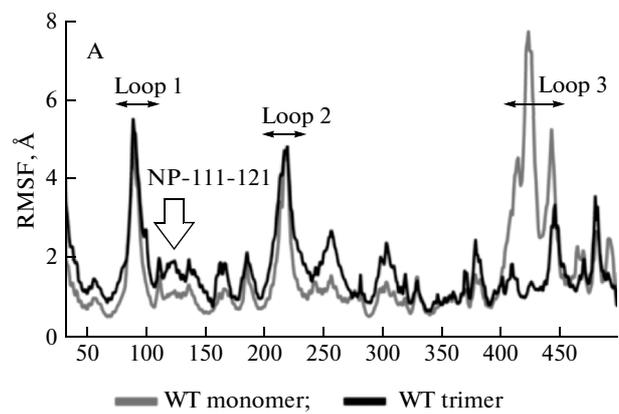


Рис. 5. Локализация домена YDKEEIRRIWR в белке NP вируса гриппа H1N1pdm09 в линкерной области петель 1 и 2 [23]

эпитоп локализовался на N-конце белка NP вируса H1N1pdm-2009. Структура эпитопа поразительным образом совпадала с последовательностью, экспонированной на первом внеклеточном домене гипокретинового/орексिनорного рецептора 2-го типа. Уровень гомологии вирусной и клеточной детерминант допускал мимикрию и высокую вероятность перекрёстного иммунного ответа.

Обращает на себя внимание, что домен, вызывающий аутоиммунный ответ, экспонирован на поверхности молекулы. Последовательность этого домена сравнительно нейтральна в отношении мутаций, связанных с патогенностью. Поэтому иммунный ответ на этот домен вряд ли может иметь отношение к защите от инфекции, но последствия иммунного ответа драматичны с точки зрения развития нарколепсии.

На рисунке 5 показана локализация домена NP-111-121 в молекуле белка NP между петель 1 и 2.

На рисунке 6 треугольником с полосой выделена последовательность YDKEEIRRIWR, которая локализована в протяжённом сайте взаимодействия белка NP с субъединицей РНК-полимеразы. Субъединица PB2 несёт уникальные функции – связывается с m7GTP хозяйских мРНК и поддерживает активность эндонуклеазы субъединицы PA для удаления кэп-содержащих фрагментов клеточных мРНК, что обеспечивает генерирование праймеров для синтеза вирусных матричных РНК. Взаимодействие с белком NP играет важную роль в самосборке функционально активного нуклеоида вируса гриппа. Возможно, антитела к этому домену могут интерферировать с функциями образования комплексов белков PB2 и NP, снижая репликативную активность вируса. Для развития нарколепсии значимым является цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ. При этом нарколепсия сцеплена с гаплотипом HLA DQA1*01:02-DQB1*06:02, а её наиболее тя-

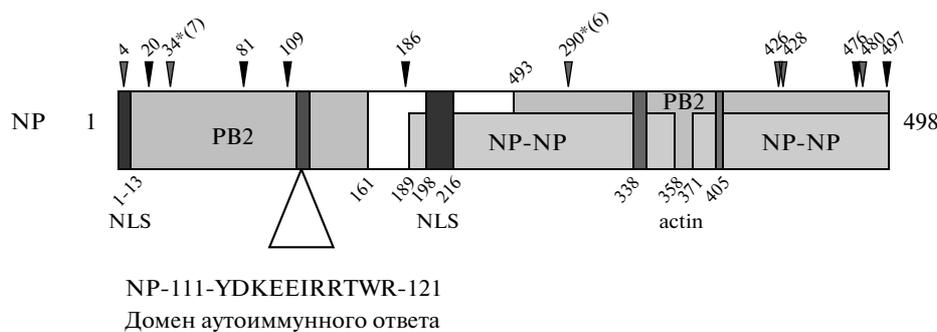


Рис. 6. Позиционирование аутоиммунного домена белка NP на структурно-функциональной карте вирусного нуклеопротеина

жёлтые формы — с DQA1*01:02-DQB1*06:02 в комбинации с DRB1*15:01 и геном гипокретин/орексина. Антитела к гипокретинному рецептору блокируют связывание нейропептида орексина и нарушают регуляцию сна и бодрствования [23].

В нашей стране, начиная с 1980-х годов, используются субъединичные вакцины, не содержащие внутренних антигенов и белка NP. Это основа их безопасности. Позднее они были усовершенствованы благодаря технологии производства полимер-субъединичных вакцин. Безопасность отечественных вакцин обеспечивается не только использованием поверхностных антигенов, направленных на формирование вирус-нейтрализующего иммунитета к гемагглютиниру и нейраминидазу. Важной составляющей является также функциональный адъювант, поддерживающий нативную структуру антигенов. Вакцинные композиции полностью исключают наличие в препаратах белка NP и других малоизученных компонентов. Дальнейший путь усовершенствования вакцин состоит в промышленном использовании отечественных универсальных противогриппозных вакцин, содержащих целенаправленно синтезированные безопасные эпитопы вирусных белков.

Своевременное внедрение безопасных вакцин и новейших технологий позволило избежать в России катастрофы, которая произошла в Европе и других странах. Прогресс в этой области продолжается. Геномные исследования иммунного ответа на вакцинацию открывают перспективы выбора адъювантов, конструирования функциональных вакцин и эпитопных генетически адаптированных вакцинных препаратов нового поколения.

Примером целенаправленного конструирования безопасных вакцин на основе выбранных эпитопов являются исследования академиков К.Г. Скрябина и О.И. Киселёва с их коллективами [25].

На рисунке 7 представлена схема конструирования полиэпитопных вакцин и строение модуля — носителя. Преимущество данной технологии состоит в выборе эпитопов, способных индуцировать иммунный ответ на широкий спектр патогенных вирусов гриппа в соответствии с пандемическими прогнозами на несколько лет вперёд. Путём мутагенеза эпитопы вирусных антигенов могут быть адаптированы к определённым группам населения с определёнными специфичностями HLA, что обеспечит их высокую репрезентативность среди групп целевой вакцинации. Эф-

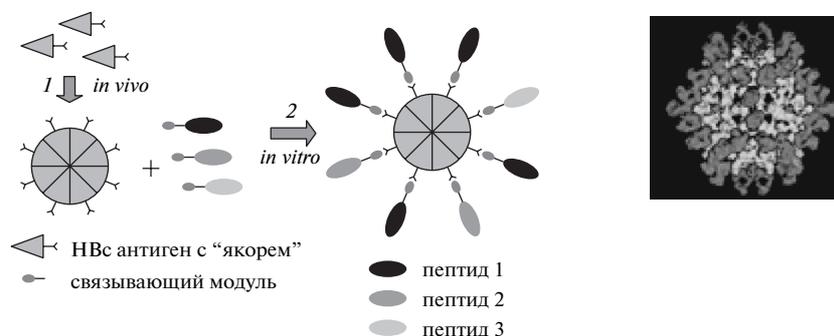


Рис. 7. Конструирование эпитопных универсальных вакцин против сезонного и пандемического гриппа
1 — самосборная НВс в немодифицированных частицах; 2 — связывание эпитопов/пептидов, присоединённых к связывающему модулю, к НВс частицам

фективная “универсальная” противогриппозная вакцина должна включать различные консервативные компоненты в одном препарате. Решение — наночастицы ядерного антигена вируса гепатита В, несущие заданный набор различных эпитопов и иммуномодуляторов. Наноситель — частица Нbc — может быть заменена на любой другой корпускулярный наноситель или природный адъювант. Существует ряд других преимуществ, которые подлежат патентованию.

Предлагаемый подход позволит на основе достижений современной генетики человека революционизировать многие направления развития отечественной медицины — от системы вакцинации до создания нового поколения вакцин, от трансплантации органов и тканей до разработки противораковых вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпова Л.С., Ишкина Е.Р., Столяров К.А. и др. Оценка “дополнительной” смертности от соматических и инфекционных заболеваний в различных возрастных группах населения Санкт-Петербурга в период эпидемии гриппа с 2006 по 2010 год // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. № 1. С. 50–58.
2. Chowell G., Ayala A., Berisha V., Viboud C., Schumacher M. Risk Factors for Mortality among 2009 A/H1N1 Influenza Hospitalizations in Maricopa County, Arizona, April 2009 to March 2010 // Computational and Mathematical Methods in Medicine. 2012. Article ID 914196. P. 8. doi: 10.1155/2012/914196.
3. Paul E., Bunce P.E., Sasha M. et al. Pandemic H1N1 Influenza Infection and Vascular Thrombosis Clin. Infect. Dis. 2011. V. 52. № 2. P. e14–e17. doi: 10.1093/cid/ciq125.
4. Influenza-Associated Intensive-Care Unit Admissions and Deaths — California, September 29, 2013–January 18, 2014 // Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). 2014. V. 63. P. 143–147.
5. Fiore A.E., Uyeki T.M., Broder K. et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010 // MMWR Recomm Rep. 2010. V. 59. P. 1–62.
6. Mazick A., Gergonne B., Nielsen J. et al. Excess mortality among the elderly in 12 European countries, February and March 2012 // Euro Survey. 2012. V. 17. pii=20138.
7. Грипп. Эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / Под ред. О.И. Киселёва, Л.М. Цыбаловой, В.И. Покровского. М.: Медицинское информационное агентство, 2012.
8. Wilson N., Barnard L.T., Summers J.A. et al. Differential Mortality Rates by Ethnicity in 3 Influenza Pandemics Over a Century, New Zealand // Emerg Infect Dis. 2012. V. 18. P. 71–77.
9. Киселёв О.И., Комиссаров А.Б., Кошкина О.С. и др. Мутации в генах человека, повышающие риск тяжёлого течения гриппозной инфекции // eMIR, Microb.Independ. Res. J. 2015. V. 1. № 1. P. 1–9.
10. Keynan Y., Malik S., Fowke K.R. The Role of Polymorphisms in Host Immune Genes in Determining the Severity of Respiratory Illness Caused by Pandemic H1N1 Influenza // Public Health Genomics. 2013. № 16. P. 9–16.
11. Zhang Y.H., Zhao Y., Li N., Peng Y.C. Interferon induced transmembrane protein-3 genetic variant rs12252-C is associated with severe influenza in Chinese individuals // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 1418.
12. Feeley E.M., Sims J.S., John S.P., et al. IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry // PLoS Pathog. 2011. V. 7. e1002337.
13. Wee Y.S., Roundy K.M., Weis J.J., Weis J.H. Interferon inducible transmembrane proteins of the innate immune response act as membrane organizers by influencing clathrin and v-ATPase localization and function // Innate Immun. 2012. V. 18. P. 834–45.
14. Shiina T., Hosomichi K., Inoko H., Kulski J.K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease // Journal of Human Genetics. 2009. № 54. P. 15–39.
15. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Болдырева М.Н., Сароянц Л.В. Полиморфизм генов иммунного ответа и его роль в противинфекционной защите // Иммунология. 2013. № 3. С. 132–144.
16. Martin M.P., Carrington M. Immunogenetics of viral infections // Curr. Opin. Immunol. 2005. V. 17. P. 510–516.
17. Fellay J., Shianna K.V., Ge D. et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1 // Science. V. 317. P. 944–947.
18. Fernando M.M., Stevens C.R., Walsh E.C. et al. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis // PLoS Genet. 4. e1000024 (2008).
19. Hertz T., Oshansky C.M., Roddam P.L. et al. HLA targeting efficiency correlates with human T-cell response magnitude and with mortality from influenza A infection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 33. P. 13492–13497.
20. Hertz T., Nolan D., Ian James J. et al. Mapping the landscape of host-pathogen coevolution: HLA class I binding and its relationship with evolutionary conservation in human and viral proteins // Journal Virol. 2011. V. 85. № 3. P. 1310–1321.
21. Blackwell J.M., Jamieson S.E., Burgner D. HLA and Infectious Diseases. Clin. Microbiol. Rev. April 2009. V. 22. № 2. P. 370–385.
22. Ahmed S.S., Volkmath W., Duca J. et al. Antibodies to influenza nucleoprotein cross-react with human hypocretin receptor 2 // Sci. Transl. Med. 2015. № 7. 294ra105.
23. Stern L.J., Calvo-Calle J.M. HLA-DR: Molecular insights and vaccine design // Curr. Pharm. Des. 2009. V. 15. P. 3249–3261.
24. Jacob L., Leib R., Ollila H.M. et al. Comparison of Pandemrix and Arpanrix, two pH1N1 AS03-adjuvanted vaccines differentially associated with narcolepsy development Brain // Behaviour and Immunity. 2015. V. 47. P. 44–57.
25. Киселёв О.И. Прогресс в создании пандемических противогриппозных вакцин и технологии их производства // Биотехнология. 2010. № 2. С. 1–25.

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН О.Н. ЧУПАХИНА^а,
АКАДЕМИКА РАН В.Н. ЧАРУШИНА^а, ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН В.Л. РУСИНОВА^б

^аИнститут органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия

^бУральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

e-mail: chupakhin@ios.uran.ru, charushin@ios.uran.ru, v.rusinov@ustu

Поступил в редакцию 22.01.2016 г.

В докладе рассмотрены результаты работ уральской научной школы химиков-органиков по созданию противовирусных и антибактериальных, в том числе противотуберкулёзных, химиопрепаратов. Обобщены данные фундаментальных исследований по синтезу и изучению противовирусной активности, установлению метаболизма и механизма действия соединений азолоазинового ряда — азааналогов аденина и гуанина, а также их нуклеозидов, что привело к созданию нового семейства противовирусных веществ. Одно из них — триазабирин — вошло в практику терапии как противогриппозный препарат. Обсуждаются также результаты синтетических и биологических исследований замещённых пиримидинов, нуклеозидов бензимидазольного и пуринового ряда и других биологически активных азазетероциклов.

Ключевые слова: триазабирин, триазид и другие производные азолоазинов, ингибиторы протеиндисульфидизомеразы, нуклеозиды фторсодержащих бензимидазолов и пуринов, антибактериальные фторхинолоны, ингибиторы бактериальной ДНК-гиразы, кинетическое разделение интермедиатов, синтез левофлоксацина.

DOI: 10.7868/S0869587316060153

В создание синтетических и полусинтетических лекарственных препаратов, доминирующих сегодня на мировом фармацевтическом рынке, большая часть которых представлена соединениями, имеющими гетероциклическую природу, весомый вклад вносит органическая химия. Авторы представляют одну из старейших российских школ в области гетероциклической химии, у истоков которой стоял академик АН СССР Исаак Яковлевич Постовский, получивший образование в Мюнхенской высшей технической школе (Германия), где он работал в лаборатории нобелевского лауреата Ганса Фишера. Научной школой И.Я. Постовского создано целое семейство лекарственных препаратов — от сульфидина, первого отечественного антибактериального препарата, сыгравшего исключительно важную роль в

лечении раненых в годы Великой Отечественной войны, до противовирусного триазабирина, появившегося в аптечной сети совсем недавно.

Сегодня на Урале разрабатываются противоопухолевые, радиозащитные и кардиотропные препараты. В докладе будут освещены работы по созданию средств для борьбы с инфекционными заболеваниями, что входит в число приоритетных задач отечественной науки.

Противовирусные препараты. По оценкам экспертов, вирусные заболевания в периоды эпидемий затрагивают от 10 до 20% населения страны, ежегодно нанося экономический ущерб, достигающий 10 млрд. руб. Вместе с тем арсенал противовирусных средств, которыми располагает медицина, довольно ограничен. Наряду с зарубежным препаратом тамифлю на российском рынке представлены ремантадин, арбидол и в последнее время — ингавирин.

Создание препаратов, эффективных в отношении гриппа и других вирусных инфекций, с учётом высокой изменчивости вирусов остаётся одной из актуальных и наиболее сложных задач медицинской химии. В этой связи следует напомнить об открытии строения ДНК — выдающемся научном

ЧУПАХИН Олег Николаевич — академик РАН, научный руководитель ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН. ЧАРУШИН Валерий Николаевич — академик РАН, председатель УрО РАН, директор ИОС им. И.Я. Постовского УрО РАН. РУСИНОВ Владимир Леонидович — член-корреспондент РАН, директор Химико-технологического института УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина.

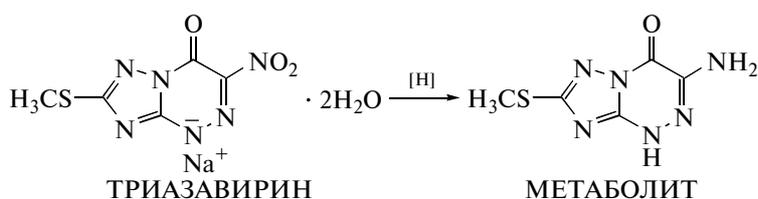
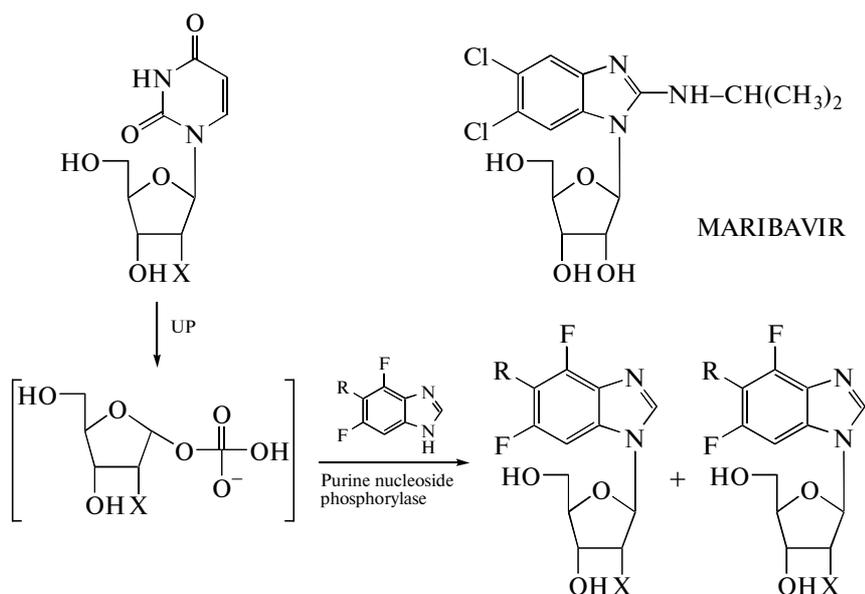
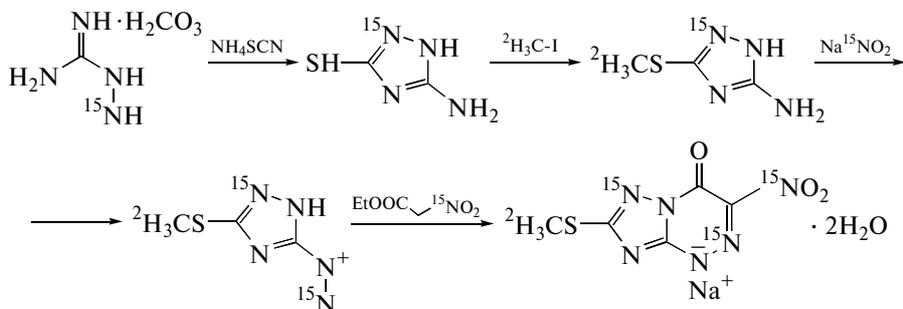


Рис. 4. Метаболическая трансформация триазавирина



сти) и ООО «Уральский центр биофармацевтических технологий» (г. Екатеринбург) организован промышленный выпуск препарата, с 2014 г. он продаётся через аптечную сеть [2–11].

Триазавирин эффективен в отношении широкого спектра вирусов гриппа (H1N1, H5N1, H5N2, H7N3, H9N2), респираторно-синцитиальной инфекции, парагриппа, аденовируса и других. Индекс эффективности в отношении вирусов гриппа типов А и В составляет 65–80%. Важ-

но, что новый препарат эффективен на всех стадиях развития вирусной инфекции, как при профилактической, так и при лечебной схеме введения. Высокая противовирусная активность триазавирина продемонстрирована также в отношении возбудителей клещевого энцефалита и геморрагических лихорадок [10, 11].

Препарат триазавирин относится к малотоксичным лекарственным веществам IV класса [4, 5]. Клиническими исследованиями (фазы I–III) установлено, что использование триазавирина в этиотропной терапии гриппа сокращает продолжительность основных симптомов заболевания (интоксикация, лихорадка, катаральные проявления), способствует быстрой нормализации температуры в терапевтических группах и снижению уровня повторного выделения вирусов [8]. При сравнительной оценке эффективности препаратов триазавирин и тамифлю показано, что по ряду параметров триазавирин превосходит тамифлю. Так, в группе пациентов, получавших триазавирин, время выздоровления, длительность температурной реакции, головной боли и миалгий были статистически достоверно ниже, чем в группе принимав-

ших тамифлю. Уровень повторного выявления РНК вирусов гриппа на 5-е сутки заболевания по результатам ПЦР-диагностики для группы, принимавшей триазавирин, был намного ниже, чем для группы сравнения (рис. 2).

Высокая эффективность триазавирина клинически доказана испытаниями во многих городах России. Особо отметим, что огромную роль в создании препарата и организации клинических

испытаний сыграл наш коллега, директор Института гриппа Минздрава РФ академик РАН О.И. Киселёв, ушедший из жизни в ноябре 2015 г.

Параллельно с клиническими исследованиями изучался механизм действия триазавирина. Установлено: мишенью препарата является вирусный белок гемагглютинин, что подтверждено экспериментально методом поверхностного плазмонного резонанса. Выполнено компьютерное моделирование взаимодействия триазавирина с гемагглютинином пандемического вируса гриппа A/California/04/ 2009(H1N1). Идентифицированы короткие последовательности: SKLRGV (Цис-Лиз-Лей-Арг-Гли-Вал), LGK (Лей-Гли-Лиз), FYKLIW (Фен-Тир-Лиз-Асп-Лей-Изо-Трп), определяющие нековалентное взаимодействие гемагглютинина вируса гриппа с триазавирином (рис. 3).

Получены экспериментальные данные, показывающие важную роль взаимодействий триазавирина с SH-фрагментами аминокислот, а также подтверждающие наличие в третичной структуре гемагглютинина дисульфидных связей между остатками цистеина в положениях 59, 292, 296 и 320. Эти данные предполагают участие как триазавирина, так и фермента, ответственного за образование и изомеризацию дисульфидных связей, так называемой протеиндисульфидизомеразы. Для доказательства этой версии использованы модельные пептиды HA-I: DCNTTCQ; HA-II: YGNCNTKCKQ; HA-III: LCKLGGIAPLHLGKCN-amid, содержащие по два цистеиновых остатка. После инкубирования модельных пептидов с триазавирином в физиологических условиях проводился анализ продуктов взаимодействия методом масс-спектрометрии. Показано, что триазаваирин способствует образованию S-S связей, причём наряду с внутримолекулярными S-S связями образуются межмолекулярные дисульфидные связи, ведущие к димерным структурам. Как мономерная, так и димерные S-S формы отчётливо проявляются в масс-спектрах, свидетельствуя об окислительной функции триазавирина). Эти результаты хорошо согласуются с данными фармакокинетики, которые показывают, что, выполняя роль окислителя тиольных

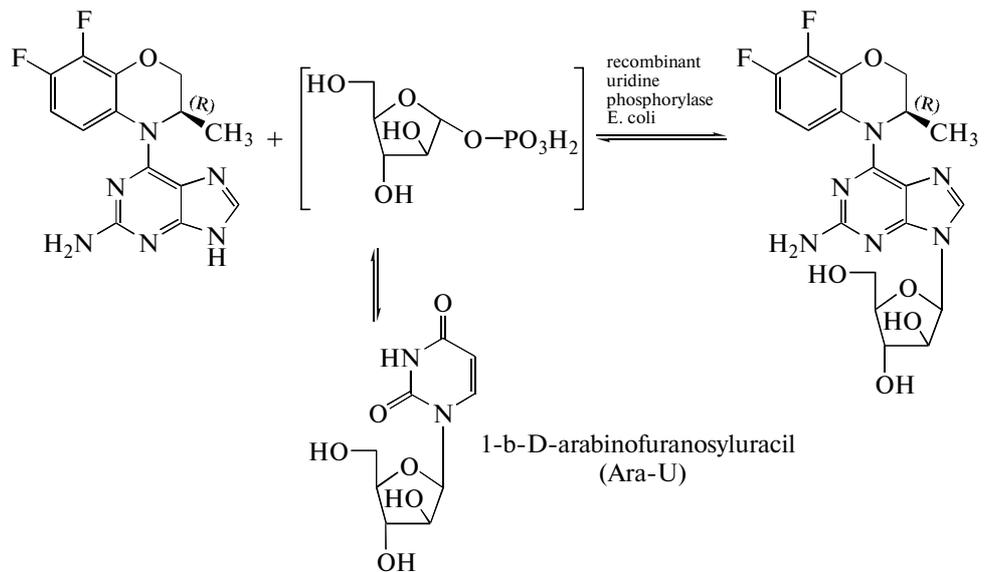


Рис. 7. Синтез нуклеозидов 2-аминопурина

групп, триазаваирин трансформируется из нитропроизводного в соответствующее аминосоединение, которое показывает лишь слабый противовирусный эффект (рис. 4). Экспериментально установлено также, что триазаваирин ингибирует ферментативную активность протеиндисульфидизомеразы, нарушая тем самым формирование третичной структуры гемагглютинина и жизненный цикл вируса.

Для изучения фармакокинетики и метаболизма препарата проведен синтез триазавирина, меченного изотопами ²H и ¹⁵N [7]. Натриевая соль [²H₃, ¹⁵N₃]-2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-c][1,2,4]триазин-7-она, дигидрат, содержащая избыток атомов дейтерия в метилтиогруппе, избыток изотопов атомов азота в положениях 1 и 5, а также нитрогруппе молекулы триазавирина, получена исходя из заведомо обогащённых синтонов (рис. 5).

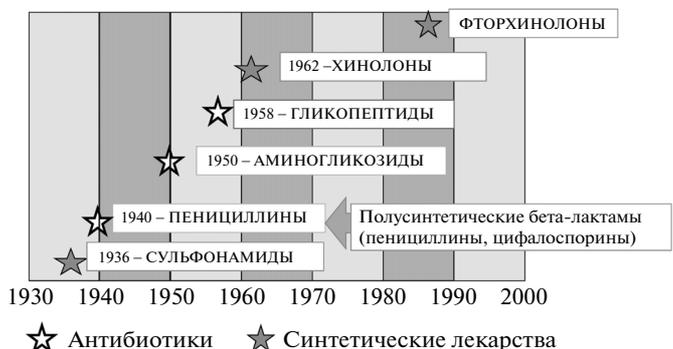


Рис. 8. Основные вехи создания препаратов для борьбы с бактериальными инфекциями

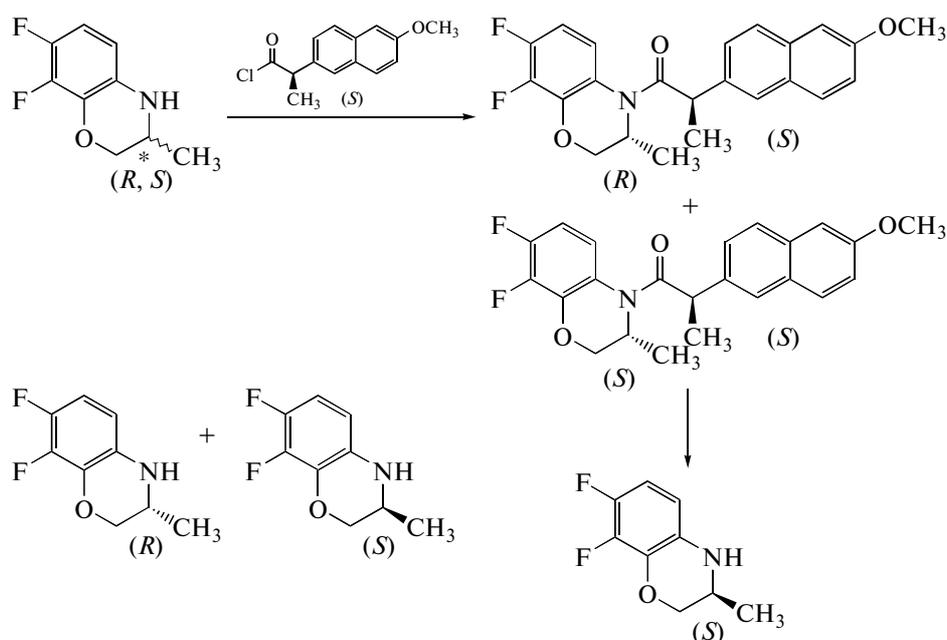


Рис. 9. Ключевая стадия синтеза энантимерно чистого препарата левофлоксацин

При поддержке Министерства промышленности и торговли РФ нами совместно с ПАО «Фармстандарт» ведётся работа по созданию нового противовирусного препарата из того же семейства азолозаинов, что и триазавирин. Рабочее название препарата — триазид. К настоящему времени завершены доклинические исследования и началась первая фаза клинических испытаний.

Говоря о поиске противовирусного действия химических соединений других рядов, отметим, что хорошие перспективы имеют также результаты наших совместных с Институтом биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН исследований по энзиматическому трансгликозилированию азагетероциклов (академик РАН А.И. Мирошников), в ходе которых разработаны методы синтеза нуклеозидов на основе фторсодержащих бензимидазолов (аналогов марибавира) (рис. 6) [12, 13], а также в ряду производных 2-аминопурина (рис. 7) [14]. Полученные вещества демонстрируют значительный уровень активности в отношении вирусов герпеса.

Антибактериальные препараты. Для борьбы с бактериальными инфекциями мировой наукой созданы разнообразные классы лекарственных средств, полученные как биотехнологическим путём, так и методами органического синтеза: от сульфамидов и пенициллинов до аминогликозидов, цефалоспоринов и энантимерно чистых фторхинолонов IV поколения (рис. 8). В условиях тех вызовов, с которыми столкнулась Россия, включая потенциальную угрозу биотерроризма, работы по созданию научных и технологических

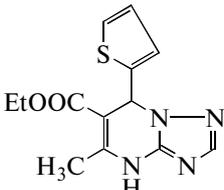
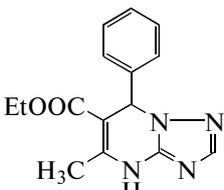
основ синтеза фторхинолонов — наиболее эффективных антибактериальных препаратов — имеют важное значение. Соединения этого ряда обладают широким спектром действия и исключительно высоким уровнем активности. Механизм их действия связан с ингибированием бактериальной ДНК-гиразы. Фторхинолоны — единственный класс препаратов, способных конкурировать с бета-лактамами антибиотиками. Кроме того, они наименее уязвимы в плане резистентности микроорганизмов [16, 17].

В ИОС УрО РАН и УрФУ выполнен обширный цикл работ по синтезу важнейшего класса син-

тетических антибактериальных препаратов фторхинолонового ряда, а также их гетероаналогов в рядах би-, три- и полициклических фторсодержащих гетероциклов [15–19]. Совместно с Институтом органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (академик РАН О.М. Нефёдов) и Институтом катализа им. Г.К. Борескова СО РАН (академик РАН В.Н. Пармон) создана универсальная платформа для получения исходных фтораренов, ключевых интермедиатов и фторхинолонов на их основе, прошедшая апробацию на опытном заводе Волгоградского филиала Института катализа СО РАН.

Новое поколение антибактериальных средств, фторхинолоны XXI в., представлены целым рядом энантимерно чистых препаратов, таких как левофлоксацин и моксифлоксацин. В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского разработаны научные основы кинетического разделения рацемических интермедиатов, используемых в синтезе левофлоксацина и других энантимерно чистых препаратов (рис. 9). Технология получения левофлоксацина реализована в опытно-промышленном масштабе. Совместно с Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН показано его соответствие высоким стандартам качества, в том числе в эксперименте по ингибированию бактериальной ДНК-гиразы (член-корреспондент РАН С.Н. Кочетков). В результате совместных с Институтом фармакологии им. В.В. Закусова исследований (руководитель работ академик РАН С.Б. Середенин) создана новая лекарственная форма препарата левофлоксацин.

Активность в отношении микобактерий туберкулёза

Соединение	Минимальная ингибирующая концентрация в отношении микобактерий туберкулёза (МИС, мг/мл)			
	H37Rv	M. Avium	M. Terrae	MDR
	0.7	0.7	0.7	1.5
Enantiomer 1	0.7	0.7	0.7	0.7
Enantiomer 2	0.7	0.3	0.3	0.7
	1.5	1.5	1.5	3.1
Isoniazid	0.1	0.1	0.1	—

Эпидемиологическая обстановка в России свидетельствует об исключительной важности поисковых работ, нацеленных на выявление эффективных ингибиторов протеинкиназ микобактерий туберкулёза и создание на этой основе эффективных противотуберкулёзных препаратов, поражающих возбудителей, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью. Эти исследования ведутся в ИОС УрО РАН совместно с Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (отдел доктора биологических наук В.Н. Даниленко) и Уральским НИИ фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения РФ (г. Екатеринбург, руководитель работ доктор медицинских наук С.Н. Скорняков) [20, 21]. В частности, в Институте органического синтеза УрО РАН получены производные пиримидинового ряда, обладающие высокой противотуберкулёзной активностью, которые перспективны для углублённого изучения. Следует отметить, что для синтеза биологически активных пиримидинов в работе использована методология прямой C-N-функционализации пиримидинового кольца под действием нуклеофильных реагентов [22]. Изучена также противотуберкулёзная активность энантимерно чистых производных конденсированных пиримидинов (табл.). Эти данные создают основу для дальнейшего направленного поиска веществ, эффективных в отношении штаммов микобактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Решение этой проблемы исключительно важно для российского здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Чупахин О.Н., Чарушин В.Н. Азоло[5,1-с]-1,2,4-триазины – новый класс противовирусных соединений // Известия АН. Серия химическая. 2008. № 5. С. 967–995.
2. Чупахин О.Н., Русинов В.Л., Уломский Е.Н. и др. Натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-7-оксо-[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-(4Н)-она, дигидрат, обладающая противовирусной активностью. Патент RU 2294936 С1. 2007.
3. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Максимов В.А. и др. Изучение противовирусной активности триазавирина в отношении возбудителя гриппа А(Н5N1) в культуре клеток // Антибиотики и химиотерапия. 2007. Т. 52. С.18–20.
4. Karpenko I., Deev S., Kiselev O. et al. Antiviral properties, Metabolism, and Pharmacokinetics of a novel Azolo 1,2,4,-Triazine derived inhibitor of influenza A and B virus replication // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010. V. 54. 2017–2022.
5. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Русинов В.Л. и др. Оценка токсичности нового отечественного химиопрепарата триазавирин // Антибиотики и химиотерапия. 2012. Т. 57. С. 8–10.
6. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Максимов В.А. и др. Лечебная эффективность нового отечественного препарата триазавирин в отношении возбудителя гриппа А (Н5N1) // Антибиотики и химиотерапия. 2011. Т. 56. С. 10–13.
7. Шестакова Т.С., Халымбаджа И.А., Деев С.Л. и др. Синтез противовирусного препарата “триазавирин”, меченного изотопами ²H и ¹⁵N // Известия АН. Серия химическая. 2011. № 4. С. 714–717.
8. Киселёв О.И., Деева Э.Г., Мельникова Т.И. и др. Новый противовирусный препарат “триазавирин”.

- Результаты II фазы клинического исследования // Вопросы вирусологии. 2012. Т. 57. С. 9–12.
9. Деева Э.Г., Русинов В.Л., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н., Киселев О.И. Противовирусный препарат триазавирин: от скрининга до клинической апробации // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. Т. 2. № 7. С. 144–151.
 10. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Русинов В.Л. и др. Изучение противовирусной активности триазавирин в отношении возбудителя клещевого энцефалита в культуре клеток // Антибиотики и химиотерапия. 2014. Т. 59. С. 3–5.
 11. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Русинов В.Л. и др. Изучение профилактической эффективности триазавирин в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита у белых мышей // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60. С. 8–11.
 12. Konstantinova I.D., Selezneva O.M., Fateev I.V. et al. Chemo-Enzymatic Synthesis and Biological Evaluation of 5,6-Disubstituted Benzimidazole Ribo- and 2'-Deoxyribonucleosides // Synthesis. 2013. V. 45. P. 272–280.
 13. Kharitonova M.I., Fateev I., Kayushin A.L. et al. Chemo-Enzymatic Synthesis and Antiherpesvirus Activity of 5-Substituted 4,6-Difluorobenzimidazoles Ribo- and 2'-Deoxyribo- Nucleosides // Synthesis. 2015. V. 48. P. 394–406.
 14. Eletskaia B.Z., Kostantinova I.D., Paramonov A.S. et al. Chemoenzymatic arabinosylation of 2-aminopurines bearing the chiral fragment of 7,8-difluoro-3-methyl-3,4-dihydro-2H-[1,4]benzoxazines. // Mendeleev Communications. 2016. V. 26. P. 6–8.
 15. Носова Э.В., Липунова Г.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. Фторсодержащие азины и бензазины. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2011.
 16. Чарушин В.Н., Носова Э.В., Липунова Г.Н., Чупахин О.Н. Фторхинолоны: синтез и применение. М.: Физматлит, 2013.
 17. Charushin V.N., Lipunova G.N., Nosova E.V., Chupakhin O.N. Fluoro-quinolones: Synthesis and Application // Fluorine in Heterocyclic Chemistry. V. Nena-jdenko (Ed.). V. 2. Springer, 2014. P. 111–180.
 18. Nosova E.V., Mochulskaya N.N., Kotovskaya S.K. et al. Fluorinated benzazoles and benzazines // Heteroatom Chemistry. 2006. V. 17. P. 579–594.
 19. Lipunova G.N., Nosova E.V., Charushin V.N., Chupakhin O.N. Fluorine-containing pyrazoles and their condensed derivatives: Synthesis and biological activity // Journal of Fluorine Chemistry. 2015. V. 175. P. 84–109.
 20. Verbitskiy E.V., Cheprakova E.M., Slepukhin P.A. et al. Synthesis, and structure–activity relationship for C(4) and/or C(5) thienyl substituted pyrimidines, as a new family of antimycobacterial compounds // European Journal of Medicinal Chemistry. 2015. V. 97. P. 225–234.
 21. Verbitskiy E.V., Slepukhin P.A., Kravchenko M.A. et al. Synthesis, antimycobacterial and antifungal evaluation of some new 1-ethyl-5-(hetero)aryl-6-styryl-1,6-dihydro-pyrazine-2,3-dicarbonitriles // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2015. V. 25. P. 524–528.
 22. Charushin V.N., Chupakhin O.N. (Eds). Metal Free C-H Functionalization of Aromatics. Nucleophilic Displacement of Hydrogen // Topics in Heterocyclic Chemistry, V. 37. Springer, 2014.

РАСТИТЕЛЬНОЕ БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН В.А. БЫКОВА

ВНИИ лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

e-mail: vilarnii@mail.ru

Поступил в редакцию 28.01.2016 г.

Как известно, в основе создания эффективных и безопасных лекарственных средств лежат приоритетные направления научно-технического прогресса, основанные на новых знаниях в области жизни и технологий живых систем. По сути всё многообразие биотехнологии направлено на использование биообъектов в качестве средств производства прежде всего эффективных и безопасных лекарств, среди которых доля фитопрепаратов и биологически активных субстанций из растений составляет 60–65%.

Ключевые слова: лекарственные растения, фитопрепараты, Аптекарский огород, ВИЛАР, съедобные вакцины, мобилизация.

DOI: 10.7868/S0869587316060165

С незапамятных времён люди использовали растения для лечения различных заболеваний. Упоминания о лекарственных растениях можно встретить в китайской, египетской, тибетской, греческой, римской и других культурах. В частности, стоит обратить внимание на “Книгу приготовления лекарств для всех частей тела” – папирус, найденный немецким египтологом Г. Эберсом в XIX в. Там содержатся рецепты мазей, примочек, микстур с довольно сложным составом. В Древнем Египте широко применялись душистые масла, бальзамы, смолы и камеди, были хорошо известны целебные свойства клещевины, алоэ, лотоса, акации, аниса, белены, льна, мака, мяты, подорожника, можжевельника и др. Не менее известен “Травник Шень-Нуна”, первоначальный текст которого (формировавшийся с III в. до н.э. по I в. н.э.) не сохранился, но был интегрирован в “Канон корней и трав”, который в свою очередь явился основой для последующих трудов [1]. Обширный сборник “Исследования о растениях” (около 370–287 гг. до н.э.) древнегреческого учёного Феофраста содержал информацию не только о средиземноморских растениях, но и о тропических, о которых стало известно после похода Александра Македонского в Индию (327 г. до н.э.).

С 1500 г. на территорию Европы завезли гваяковое дерево, ипекакуану (рвотный корень), хину, сенегу, алоэ, коку, табак, перец, подсолнечник и т.д. А уже в 1545 г. в Падуе (Италия) по решению Венецианского сената был заложен первый в ми-

ре сад лекарственных растений с целью выращивания лечебных трав для медицинского факультета Падуанского университета.

В России небольшие сады лечебных растений существовали при аптеках. Самая первая из них появилась при царском дворе в конце XVI в., а в 1620 г. был основан Аптекарский приказ, передавший аптеки в ведение государства. К 1672 г. аптекарских огородов было уже три, выращивались там и привозные растения. Они снабжали медиков сырьём для приготовления лекарств. В 1707 г. на северной окраине Москвы по указу Петра I был заложен Аптекарский огород. Выращиваемые здесь растения использовались не только для приготовления лекарств, но и для обучения студентов-медиков ботанике. Для ухода за огородом приглашались иностранные садовники. Первым директором стал Т. Гербер – немецкий врач, доктор медицины и ботаники из Лейпцигского университета. Он стал изучать флору Европейской части России, организовывал экспедиции, занимался сбором дикорастущих лекарственных растений, образцов трав, корней и семян для аптек, составлением гербариев. На протяжении уже более трёх веков Аптекарский огород продолжает выполнять свою миссию – рассказывать об удивительном мире растений и их значении для всей Земли [2, 3].

В 1931 г. на базе Научно-исследовательского бюро по лекарственным и душистым растениям был создан Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). В настоящее время в его состав входят 12 научных отделов, ботанический сад лекарственных и ароматических растений и

БЫКОВ Валерий Алексеевич – академик РАН, главный научный сотрудник ФГБНУ ВИЛАР.

Таблица 1. Использование видового состава растений для лекарственных целей в ряде стран мира

Страна	Число видов высших растений		
	на территории страны	в народной медицине	в научной медицине
Россия	12500	2000	326
Китай	30000	4000	500
США и Канада	15000	2600	250
Германия	3500	1000	130
Япония	6500	1500	350

три филиала – Белгородский, Северо-Кавказский и Средневолжский [4, 5]. Сотрудниками института разработано свыше 100 лекарственных средств, среди которых противоопухолевый препарат розевин, противовирусные алпизарин и гипорамин, антибактериальные сангвиритин и эвкалимин, противогрибковый анмарин, сердечно-сосудистые дигидроэргокристин, диквертин, целанид, спазмолитик фловерин, фотосенсибилизирующий аммифурин и многие другие. Большое значение придаётся разработке новых лекарственных препаратов, действующих на нервную, сердечно-сосудистую, эндокринную системы, применяемых для лечения заболеваний внутренних органов и нарушения обмена веществ.

Прошрое столетие ознаменовалось развитием, забвением и новым ажиотажным увлечением лекарственными растениями и фитопрепаратами. Понятно, что деление растений на лекарственные и нелекарственные является условным, поскольку в ряде случаев растения, являющиеся источником сырья для производства фитопрепаратов, к лекарственным не относятся, например, листовница даурская, из которой части которой получают антиоксидант дигидрокверцетин. Кроме того, определённой фармакологической активностью обладают и сельскохозяйственные культуры. Приведём несколько примеров. Трава цветущей гречихи богата рутином, отвар из цветков применяют в качестве отхаркивающего средства, чай из листьев и цветков – при атеросклерозе и гипертонии, свежие листья – хороший антисептик. Кукурузные рыльца используют как желчегонное и мочегонное средство при воспалительных заболеваниях печени, желчного и мочевого пузыря, камнях в почках. Отвары и кисели из зёрен овса помогают при желудочно-кишечных заболеваниях, кашле; водный настой травы – потогонное, мочегонное и жаропонижающее средство; спиртовая настойка зелёного овса тонизирует при истощении, умственном переутомлении, неврастении, бессоннице. Отвар пшеничных отрубей – отхаркивающее средство при сильном кашле. Отвар ячменя и ячменный солод помогают при воспалении желудочно-кишечного тракта. Варёные бобы оказывают противодиарейный эффект, а отвар травы и семян гороха – мочегонный [6].

В мире 35–70 тыс. видов растений используются для лекарственных целей. Полный масштаб международной торговли лекарственными растениями практически не подлежит объективной оценке, так как многие растения перепродаются по нескольку раз. В США 25% лекарств содержат растительное сырьё. Потребление лекарственных растений в США, Великобритании и Италии ежегодно увеличивается на 12–15%. В Европе более 200 компаний занимаются лекарственными растениями, в США – около 220. Германия является мировым лидером в торговле сырьём с ежегодным оборотом 1.2 млрд. долл., у США оборот составляет 500 млн. долл.

Поставки импортного лекарственного сырья в Россию складываются таким образом (т/год): Украина – 677.03, Казахстан – 193, Индия – 171, Дания – 132, Армения – 128.34, Египет – 128.33, Кипр – 110, Болгария – 79.99, КНР – 85.2, Латвия – 72, Польша – 53.33, Таджикистан – 35, США – 33.33, Узбекистан – 25, Молдова – 14, Германия – 10, Индонезия – 5.2, Вьетнам – 0.1.

Очевидна необходимость наиболее полной мобилизации растительного биоразнообразия в интересах создания эффективных и безопасных лекарственных фитопрепаратов. Первоочередной задачей мобилизации является осуществление скрининга биологически активных соединений и регистрационные процедуры в отношении как растений (в качестве лекарственных), так и получаемых субстанций и готовых лекарственных форм на их основе. Потенциал и соотношение количества растений, используемых в официальной и народной медицине, по странам различается примерно на порядок (табл. 1). Для более полного использования имеющегося и апробированного ресурса биоразнообразия необходимо дальнейшее изучение и регистрация растений [2, 3, 7].

На территории России произрастают лекарственные растения, отсутствующие в фармакопеях других стран: элеутерококк колючий, лимонник китайский, пион уклоняющийся, пустырник сердечный, родиола розовая, левзея сафлоровидная, термопсис ланцетный, безвременник красивый, астрагал пушистоцветковый, вздутоплодник сибирский, гармала обыкновенная, копеечник альпийский, лабазник вязолистный, леспедеца двуцветная, леспедеца копеечниковая, секуринегга полукустарниковая, солянка холмовая, сферофиза солонцовая, шлемник байкальский.

Одним из этапов мобилизации может стать исследовательская работа по вовлечению в качестве источников лекарственного сырья биомассы возделываемых сельскохозяйственных растений. В качестве примера можно привести препараты тыквеол, получаемый из семян тыквы, рутин – из гречихи. Кроме того, экономически перспективным является выделение ксилита и ксилитана из отходов сельхозпроизводства, таких как стержни початков кукурузы, виноградные обрезки и красные листья винограда.

Таблица 2. Антигены, синтезируемые в растениях

Антиген	Источник	Растение	Стратегия
Поверхностный антиген LT-B	Вирус гепатита В	Табак, картофель, люпин, салат	А
Малярийный эпитоп	<i>E. coli</i> , энтеротоксичный штамм, ЕТЕС	Табак, картофель	А
Белок капсида	<i>Plasmodium</i> spp.	Табак	В
Петля V3 ВИЧ типа 1	Вирус Норуолк	Табак, картофель	А
Антиген DRg24	ВИЧ	Табак	В
СТ-B	Вирус бешенства	Табак	В
Инсулин, сшитый с СТ-B	<i>Vibrio cholerae</i>	Картофель	А
LT-B	Человек, ЕТЕС	Картофель	А
Антиген DRg24	ЕТЕС	Картофель	А
Гликопротеин S	Вирус бешенства	Шпинат	В
N-концевой домен гликопротеина S	Вирус гастроэнтерита свиней, TGEV	Табак	А
	TGEV	Картофель	А

Примечание. А – трансгенное растение, В – инфицирование растений химерными фитовирусами.

Процентное соотношение использования различных частей лекарственных растений следующее: трава – 24, плод – 15, лист – 14, корневища – 11, корни – 7, цветки – 7, семя – 6, побеги – 5, почки – 1, кора – 1, другое – 9.

Экспедиционные исследования показали, что природные ресурсы ценных видов лекарственных растений катастрофически истощаются в результате хищнических заготовок (родиола розовая, лапчатка белая, левзея софлоровидная, горичвет весенний и др.). Правила заготовки растений, утверждённые приказом Министерства природных ресурсов и экологии РФ от 10.04.2007 № 83, не обеспечивают сохранение биоразнообразия и биоресурсов. Многолетние залежи сельскохозяйственных угодий (более 40 млн. га) на российской территории являются источником спонтанного формирования ценозов с замещением видов растений и формированием как новых сообществ, так и патогенов.

Динамика объёма заготовок и производства лекарственного сырья в России выглядит так: в 1913 г. заготовлено 30,9 тыс. т (в том числе на экспорт – 29 тыс. т); в 1990 г. совхозами объединения “Союзэфирлекарспром” произведено 24,3 тыс. т, заготовлено – 39,5 тыс. т; в 2000 г. произведено 2600 т, заготовлено 12 тыс. т; в 2015 г. заготовлено всего около 530 т. В сложившихся условиях невозможно обойтись без таких элементов мобилизации, как интродукция, селекция, семеноводство и разработка агротехнологий. Это касается не только открытого, но и защищённого грунта теплиц, оранжерей, фитотронов, а также получения биомассы путём культивирования клеточных культур и тканей. Главной организацией в области производства лекарственного сырья является ВИЛАР. Здесь было выведено 27 сортов однолетних, 42 – многолетних, 14 – кустарниковых и 2 древесных вида. Все они зарегистрированы в

Госреестре селекционных достижений, запатентован 21 вид. Среди достижений ВИЛАРа следует отметить сохранение и пополнение 7 биокolleкций, в том числе: генетических ресурсов лекарственных и ароматических растений открытого и закрытого грунта; гербарных образцов; семян; клеточных штаммов лекарственных растений, человека, животных, микроорганизмов и дрожжей; молекулярных биотест-систем *in vitro* [8].

Институт является основным разработчиком лекарственных фитопрепаратов (80% всех российских разработок). Среди фитопрепаратов есть целый ряд оригинальных, отсутствующих за рубежом (сангвиритрин, эвкалимин и т.д.). Интересны исследования в области гомеопатии и лекарственных форм. Революционным направлением является разработка вакцин на основе трансгенных растений [9]. Это так называемые “съедобные” вакцины, изготовление которых подразумевает получение антигенов и антител человека в высших растениях, которые, как известно, свободны от микрофлоры человека, теплокровных животных и их патогенов (табл. 2).

Не менее интересно использование растений в профилактических, реабилитационных, оздоравливающих и средообразующих целях. Для фитонцидо-, арома- и эстетотерапии используют:

- фитонцидные растения-антисептики, уничтожающие бактерии и вирусы, – мирт, эвкалипт, сосна;
- ароматические растения, активно продуцирующие ароматические масла и летучие органические соединения, – лаванда, шалфей;
- растения-бронхолитики, способствующие оздоровлению лёгких, – базилик, мята;
- растения-адаптогены, повышающие устойчивость к стрессам и иммунитет организма, – эхинацея, лимонник;

- растения, обладающие седативным эффектом и обеспечивающие спокойный сон, — герань, мелисса;
- растения-стимуляторы, повышающие тонус организма, — розмарин, лимонник;
- растения-антиспазмолитики — мята, алоэ;
- газопоглощающие растения, инактивирующие формальдегид, трихлорэтилен, бензол и ксилол, — драцена, спатифиллум;
- растения, активно увлажняющие и ионизирующие воздух, — филодендрон, юкка;
- пылепоглощающие и пылеосаждающие растения — можжевельник, кипарис, туя;
- растения, поглощающие тяжёлые металлы и радионуклиды, — лён, циперус;
- растения, активно выделяющие кислород и поглощающие углекислый газ, — цитронелла, толстянка;
- растения-индикаторы загрязнения окружающей среды — хлорофитум, лишайники;
- растения, создающие микроклимат в биоценозах, — цитронелла, эвкалипт, драцена, каланхоэ, шеффлера, базилик [10].

Все мероприятия по мобилизации растительного потенциала и созданию лекарственных средств и фитопрепаратов базируются на современном фундаментальном научном обеспечении. К сожалению, на государственном уровне пока не решается вопрос о принятии крайне необходимой федеральной программы создания стандартных биомоделей и биотест-систем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях с целью обеспечения всех видов исследований, оценки безопасности и контроля качества, совершенствования существующей разрабатываемой системы.

В настоящее время бурно развивается (наряду с геномикой, протеомикой и биоинформатикой) перспективнейшее направление науки — метаболомика. Это технология, которая включает в себя набор аналитических и биоинформационных методов для количественного определения и идентификации низкомолекулярных метаболитов, присутствующих в клетке, ткани или организме. Главная цель метаболомики заключается в определении изменений в биохимическом фенотипе организма, которые являются реакцией организма на его генетическую модификацию и любые изменения в окружающей среде.

Метаболом растения — это комплекс всех низкомолекулярных метаболитов массой <1000 Da, присутствующих в биологическом образце. Предполагается, что их общее число в типичной клетке находится в пределах 1000–5000 Da. Метаболиты, являясь промежуточными соединениями биохимических реакций, играют очень важную роль в соединении различных биохимических путей, которые функционируют в живой клетке. Уровень метаболитов зависит от активности ферментов, катализирующих их превращение. В свою очередь концентрация и свойства ферментов — это

сложная функция различных регуляторных процессов, включая транскрипцию и трансляцию, регуляцию белок-белковых соединений и аллостерическую регуляцию активности ферментов путём их взаимодействия с метаболитами. Метаболом — биохимический фенотип организма, который является результатом взаимодействия гено типа с окружающей средой. В отличие от генома, транскриптома и протеома метаболом непосредственно связан с биологическими функциями организма.

Анализ метаболома проводится с применением газожидкостной хроматографии и ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Метаболомика широко применяется в области изучения механизмов биорегуляции и её результатов на эндогенном и экзогенном уровнях, а также взаимодействия фенотипа и окружающей среды. В мире уже создано более 300 метаболомных центров и лабораторий. Российские учёные активно сотрудничают с коллегами из Финляндии (Университет Турку) и создали совместную биотехнологическую лабораторию. Чрезвычайно перспективным является использование метаболомики для выявления не только биологически активных соединений, но и их предшественников. Именно предшественники значительно расширяют растительную сырьевую базу и становятся основой для последующей модификации, включая иммобилизацию действующих биологически активных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абу-Али Ибн Сина (Авиценна)*. Канон врачебной науки. Кн. 2. О простых лекарствах. Ташкент: Фан, 1956.
2. *Григорьев Н.В.* Лечебник-травник. Ч. 1, 2. М., 1882.
3. *Горецкий В., Вильк А.* Русский народный лечебный травник и цветник. Ч. 1. М.: Типография В.В. Чичерина, 1892–1893.
4. Атлас лекарственных растений СССР. М.: Изд-во медицинской литературы, 1962.
5. Атлас лекарственных растений России. М.: ВИЛАР, 2006.
6. *Ловкова М.Я., Рабинович А.М. и др.* Почему лечат растения. М.: Наука, 1989.
7. *Вольский Б.Г., Бендер К.И., Фрейман С.Л. и др.* Лекарственные растения в научной и народной медицине. Изд. 6-е. Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1981.
8. Лекарственное растениеводство / Под общ. ред. В.А. Быкова // Международная научная конференция, посвящённая 75-летию Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений. М.: ВИЛАР, 2006.
9. *Губанов И.А., Патудин А.В., Рабинович А.М.* Лекарственные растения и грибы, используемые в гомеопатии (краткий справочник). М.: Гомеопатический центр, 1995.
10. *Быков В.А., Жученко А.А.* Средообразующие фитотехнологии XXI века // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. Международное симпозиум. Пушкино, 1999.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ПУТЬ К НОВЫМ ЛЕКАРСТВАМ

© 2016 г. ДОКЛАД АКАДЕМИКА РАН В.А. СТОНИКА

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

e-mail: stonik@piboc.dvo.ru

Поступил в редакцию 11.01.2016 г.

Изучение природных соединений – научная область, лежащая на стыке биологии и химии. В докладе приведены примеры достижений в исследованиях природных биологически активных веществ и более подробно рассмотрены те из них, которые перспективны для разработки новых эффективных лекарственных средств. Основное внимание уделено фундаментальным и прикладным исследованиям, выполненным в последние годы в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Обсуждаются новые подходы к поиску и изучению природных соединений, а также перспективы работ в этом научном направлении.

Ключевые слова: природные соединения, структуры, физиологическая активность, лекарства, биопрепараты, применение, диагностика.

DOI: 10.7868/S0869587316060177

НАУЧНЫЕ ОТКРЫТИЯ И ИХ ПРИКЛАДНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Говоря о природных соединениях, обычно имеют в виду прежде всего метаболиты с молекулярными массами менее 3000 дальтон, нередко проявляющие ценные свойства и поражающие своим структурным разнообразием. На протяжении многих веков они используются, например, в составе пищевых продуктов, отваров целебных растений, в виде красителей, моющих средств. В настоящее время известно приблизительно 200 тыс. таких соединений.

Научное изучение природных соединений, начавшееся в начале XIX в., сыграло выдающуюся роль в истории естествознания. В числе первых органических веществ, выделенных в индивидуальном состоянии, были морфин (Ф. Сюртенер), хинин (Ж. Пелетье и П. Кавенту), холестерин (М. Шеврель), другие метаболиты растений и животных. Установление их строения и выяснение физиологического действия потребовало больших усилий исследователей на протяжении многих десятков лет и было завершено лишь в прошедшем столетии.

С начала XX в. особенно впечатляющие научные достижения, в том числе связанные с природными соединениями, начали отмечать нобелевскими наградами. Лауреатами этих премий

стали 45 выдающихся учёных – химиков, фармакологов, врачей, изучавших их строение и свойства (табл.). Если ещё недавно число награждённых за эти исследования в области химии и в области медицины и физиологии было почти одинаковым, то в последние годы внимание к биомедицинским свойствам природных соединений возросло и лауреатов в области медицины стало больше. Тем не менее очевиден междисциплинарный характер этих работ.

Исследования природных соединений привели к эпохальным открытиям: обнаружению новых их классов, созданию ряда принципиально новых эффективных лекарств и методов лечения болезней, изменению представлений о правильном питании, развитию новых химических технологий, например, для получения лекарств, красителей и компонентов косметики. Они изменили к лучшему жизнь людей: были побеждены многие опаснейшие болезни, в прошлом опустошавшие целые страны и континенты, значительно уменьшилась смертность от других заболеваний, выросла продолжительность жизни. Необходимо отметить, что исследования природных соединений оказались также исключительно важными и для выявления новых направлений регуляции в живых системах, они способствовали появлению эффективных методов разделения смесей веществ, развитию физико-химических методов установления строения сложных химических со-

СТОНИК Валентин Аронович – академик РАН, директор ТИБОХ им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

Учёные, изучавшие природные соединения, лауреаты Нобелевских премий

Год	Фамилия/страна	Некоторые достижения	Год	Фамилия/страна	Некоторые достижения
Лауреаты в области химии					
1902	Эмиль Фишер (Германия)	Структуры и синтез моносахаридов	1939	Адольф Бутенандт (Германия)	Изучение половых гормонов
1905	Адольф фон Байер (Германия)	Структура и синтез индиго	1939	Рудольф Ружичка (Швейцария)	Изучение терпеноидов
1910	Отто Валлах (Германия)	Структуры терпеноидов	1947	Роберт Робинсон (Великобритания)	Структуры морфина и стрихнина
1915	Рихард Вильштеттер (Германия)	Структуры алкалоидов и пигментов	1955	Винсент дю Виньо (США)	Структура и синтез окситоцина
1928	Адольф Виндаус (Германия)	Структура витамина D	1957	Александр Тодд (Великобритания)	Структуры и синтез нуклеотидов
1930	Ханс Фишер (Германия)	Структуры гемина и хлорофилла	1964	Дороти Ходжкин (Великобритания)	Рентгеноструктурный анализ витамина B12
1937	Уолтер Хоурс (Великобритания)	Структура витамина C	1965	Роберт Вудворд (США)	Синтезы природных соединений
1937	Пауль Каррер (Швейцария)	Структуры антоцианидинов и витамина A	1969	Дерек Бартон (Великобритания)	Конформационный анализ стероидов
1938	Рихард Кун (Германия)	Структуры каротиноидов	2001	Уильям Ноулз (США)	Катализаторы для синтеза природных соединений
			2001	Родзи Ноёри (Япония)	Катализаторы для синтеза природных соединений
Лауреаты в области медицины и физиологии					
1929	Фредерик Хопкинс (Великобритания)	Открытие витаминов	1964	Конрад Блох (США)	Метаболизм холестерина
1937	Альберт Сент-Дьёрди (Венгрия)	Открытие витамина C	1971	Эрл Сазерланд (США)	Открытие механизмов действия гормонов
1943	Карл Дам (Дания)	Открытие и изучение витамина K	1982	Суне Бёргстрем (Швеция)	Изучение простагландинов
1937	Эдуард Дойзи (США)	Структура витамина K	1982	Бенгт Самуэльсон (Швеция)	Изучение простагландинов, простаглицлинов и лейкотриенов
1945	Александр Флеминг (Великобритания)	Открытие пенициллина	1982	Джон Вейн (Великобритания)	Торможение аспирином биосинтеза простагландинов
1945	Эрнст Чейн (Великобритания)	Выделение и очистка пенициллина	1985	Майкл Браун (США)	Обмен холестерина
1945	Хоуард Флори (Великобритания)	Действие пенициллина на животных	1985	Джозеф Голдштейн (США)	Болезни нарушений уровня холестерина в крови
1950	Эдуард Кендалл (США)	Открытие кортизона и тироксина	1988	Гертруда Элайон (США)	Разработка ацикловира, меркаптопурина
1950	Тадеуш Рейхштейн (Швейцария)	Структура кортизона	1988	Джеймс Блэк (Великобритания)	Разработка ряда противовоспалительных лекарств
1950	Филипп Хенч (США)	Применение кортизона для лечения артрита	1988	Джордж Хитчингс (США)	Создание лекарств на основе природных соединений
1952	Зелман Ваксман (США)	Открытие стрептомицина	2015	Юю Ту (КНР)	Создание противомаларийных лекарств
1953	Фриц Липман (США)	Открытие коэнзима A	2015	Самоси Омура (Япония)	Открытие антибиотика авермектина
1957	Даниель Бове (Италия)	Концепция фармакофоров	2015	Уильям Кэмпбелл (США)	Разработка препарата ивермектина

единений, стимулировали разработку новых синтетических методов и реакций.

Один из главных прикладных результатов всесторонних исследований природных соединений — создание новых лекарств. Согласно данным Д. Ньюмана и Г. Крэгга [1] из Национального института рака США, с 1940 по 2011 г. из 175 биологически активных субстанций, разрешённых к использованию в качестве противоопухолевых веществ, только 43 получены органическим синтезом без использования природных соединений в качестве прототипов. В то же время 48.6% активных субстанций новых лекарств этого типа являются природными соединениями или получены прямой трансформацией низкомолекулярных метаболитов, остальные были их аналогами. Ещё большее влияние исследования природных веществ оказали на разработку противобактериальных, противовирусных, противогрибковых и противопаразитарных препаратов. Из 104 антиинфекционных соединений, разрешённых к использованию в 2006–2010 гг., 75% имели природное происхождение.

Показателен пример работы, удостоенной Нобелевской премии в области медицины и физиологии в 2015 г. Профессор Юю Ту из Института традиционной медицины в Пекине среди 2000 видов изученных ею растений нашла только один перспективный биологический объект, содержащий токсичные вещества для малярийных плазмодиев, резистентных к хинину и хлорохину. Необычный терпеноид артемизинин из полыни *Artemisia annua* и его производные стали активными субстанциями антималярийных препаратов третьего поколения [2] — артемизинин, артезунат и артезунат, спасающих пациентов при злокачественной малярии. Профессор Сатоси Омуре из Института Китасато в Токио среди нескольких тысяч штаммов изученных почвенных актиномицетов, выделенных его сотрудниками, нашёл штамм *Streptomyces avermitilis*, экстракты которого угнетают развитие нематоды-паразита *Nematospiroides dubius*. Профессор Уильям Кэмпбелл и сотрудники фармацевтической компании “Мерк” выделили из него антибиотик — авермектин, блокирующий глутамат-зависимые хлор-ионные каналы нематод и ракообразных, но не человека. Позднее было получено дигидропроизводное авермектина, ставшее активной субстанцией препарата ивермектин [3], впоследствии спасшего сотни тысяч человек в Центральной Африке от слепоты при паразитарном заболевании онхоцеркозе. Препарат помогает и пациентам, страдающим от других опаснейших паразитарных инфекций.

При разработке лекарств иных типов физиологического действия также широко применяются природные соединения. Отсюда можно сделать вывод, что их изучение и в настоящее время помогает исследователям выйти на один из основных путей создания новых препаратов.

ИЗУЧЕНИЕ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РОССИИ

В нашей стране исследования природных соединений ведутся в нескольких научных организациях. Например, в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН изучают метаболиты сибирских растений и получают из них новые биоактивные вещества путём химических трансформаций методами органической химии. Аналогичные работы проводятся и в Уфимском институте химии РАН. В Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН исследуют полисахариды, липополисахариды и другие глюкоконъюгаты. В настоящем сообщении будут обсуждаться в основном результаты исследований Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (ТИБОХ). Созданный в 1964 г. во Владивостоке как Институт биологически активных веществ СО АН СССР, в 1972 г. он получил своё современное название, а в 2010 г. нашему институту было присвоено имя его основателя академика Г.Б. Елякова. В институте проводятся исследования в области биоорганической химии, органической химии, молекулярной иммунологии, морской микробиологии, биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии. Объектами изучения служат природные соединения из морских организмов, включая морские микроорганизмы, а также из наземных растений Дальнего Востока России. Нашими сотрудниками выделено больше новых низкомолекулярных природных соединений, чем в любой другой научной организации страны, установлены их структуры и изучены свойства. Во многом это связано с географическим положением института: он расположен в Приморском крае — регионе наибольшего биологического разнообразия в России. В 100 км южнее Владивостока находится Морская экспериментальная станция института с лабораторным корпусом, водолазной станцией, пирсом и небольшими судами. С использованием возможностей экспериментальной станции и экспедиций на научно-исследовательском судне “Академик Опарин” ведётся сбор морского биологического материала для исследований, причём не только в российской части Японского моря, но и во многих акваториях Мирового океана.

Из морских организмов в нашем институте в последние три года было получено более 150 новых алкалоидов, полярных стероидов, гликозидов, цереброзидов, терпеноидов, хиноидных метаболитов, пептидов с противоопухолевыми, иммуномодулирующими, антибактериальными, антиоксидантными, противовоспалительными и нейропротекторными свойствами. Изучены также химические композиции ряда высших растений-эндемиков и полифенольные метаболиты лекарственных растений Дальнего Востока. В результате из наземных биологических объектов за этот период были выделены ещё около 20 новых

природных терпеноидов, гликозидов, полифенолов. Установлено строение всех этих веществ, включая абсолютные конфигурации их асимметрических центров. Осуществлён полный органический синтез нескольких природных нефтохиноидных метаболитов.

Кроме того, за этот же период из морской воды, донных осадков и с поверхностного покрова различных морских животных или поверхности растений были извлечены десятки различных микроорганизмов, в том числе около 20 новых, валидно описанных морских бактерий, которые также использовались в качестве биологических источников для выделения природных соединений [4]. Примечательно, что некоторые из более чем 150 видов морских бактерий, описанных с 1985 г. сотрудниками лаборатории морской биологии ТИБОХ под руководством члена-корреспондента РАН В.В. Михайлова, получили свои названия в честь Владивостока, Приморья, нашего института и его морской станции. В числе этих бактерий такие, как *Vitellibacter vladivostokensis*, *Marinomonas primorensis*, *Primorskiebacter sedentaris*, *Arenibacter troitensis* (названа в честь бухты Троица, на берегу которой расположена Морская экспедиционная станция), *Mesonialgae*, *Mesonialgae mobilis*, *Pibocella ponti* (в честь института, ПИВОС — английская аббревиатура его названия), *Salinobacterium amurskyense* (в честь Амурского залива, который виден из окон института), *Pseudoalteromonas elykovii*. Все собранные образцы хранятся в коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ (официальный акроним во Всемирной федерации коллекций микробных культур — КММ). Сейчас в ней насчитывается около 4000 аксенических штаммов морских бактерий и грибов.

НЕДАВНИЕ НАХОДКИ И ПОИСК НА ОСНОВЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ

Морские организмы привлекают большое внимание своими низкомолекулярными метаболитами. Среди этих соединений были найдены самые активные противораковые агенты, самые мощные небелковые токсины, наиболее эффективные анальгетики и другие представляющие интерес вещества. В результате изучения морских природных соединений в США, Японии и странах Европы была создана серия лекарств, в частности, противораковый препарат цитарабин (Ага-С), противовирусные препараты видарабин (Ага-А) и карагеллоза на основе необычных нуклеозидов одной из карибских губок (последний препарат содержит также водорослевый полисахарид йота-каррагинан), обезболивающее средство зиконотид на основе конотоксинов из моллюсков, антигиперлипидемический препарат ловаза на основе омега-3 жирных кислот морских рыб. К недавним достижениям в области создания лекарств на основе морских природных соединений можно отнести разработку противо-

опухолевых препаратов нового поколения. В их числе трабектин на основе алкалоида из асцидии (разрешён к применению в 2007 г.), эребулин мезилат на основе макроциклического полиэфирного метаболита из губки (разрешён в 2010 г.) и видотин на основе морского цитотоксина пептидной природы, химически связанного с антителами (разрешён в 2011 г.) [5].

Поиск новых высокоактивных морских природных соединений продолжается во многих странах мира, а в последние годы в нашем институте он привёл к достаточно интересным находкам (рис. 1). Губки *Monanchora pulchra* были собраны во время рейсов научно-исследовательского судна “Академик Опарин” в 2010–2015 гг. у острова Уруп Курильской гряды на глубине около 100 м. Из них получены новые алкалоиды монанхоцидин [6] и урупозидин [7]. Монанхоцидин ингибирует лейкозные клетки человека в очень малых, наномолярных концентрациях. Более того, он действует на устойчивые к цитотоксическому препарату цисплатин герминальные опухолевые клетки, преодолевая лекарственную устойчивость и вызывая в низких дозах аутофагию (самопереваривание) этих клеток, а при более высокой концентрации — их апоптоз (программируемую гибель). Недавно удалось установить необычный молекулярный механизм действия этого соединения [8].

Урупозидин в наномолярных дозах увеличивает экспрессию так называемой индуцируемой NO-синтазы в макрофагах, стимулируя эти клетки иммунной системы. Известно, что окись азота (NO), образующаяся при действии этого фермента, участвует в регуляции артериального давления, иммунитета и деятельности центральной нервной системы. Применяемый многими пациентами, страдающими от гипертонии, нитроглицерин стимулирует образование этого регулятора. (За открытие биологических функций окиси азота американские учёные Ф. Ферчготт, Ф. Мурад и Л. Игнаро получили Нобелевскую премию по медицине и физиологии 1998 г.)

Обнадёживающие результаты были получены в нашем институте и при изучении морских микроорганизмов. Новые алкалоиды корнеамиды [9] из морского изолята микроскопического гриба *Aspergillus corneus* (штамм КММ 4638), выделенного с поверхности водоросли *Laminaria sachalinensis*, показали канцерпревентивные свойства: они тормозят опухолевую трансформацию нормальных клеток, вызванную действием опухолевых промоторов.

Изучение наземных растений также привело к перспективным находкам. Было установлено, что новые гликозилированные ароматические метаболиты из корней *Maackia amurensis*, уникального древесного растения юга Дальнего Востока России, обладают сильным гепатопротекторным действием [10]. Эта работа выполнена совместно

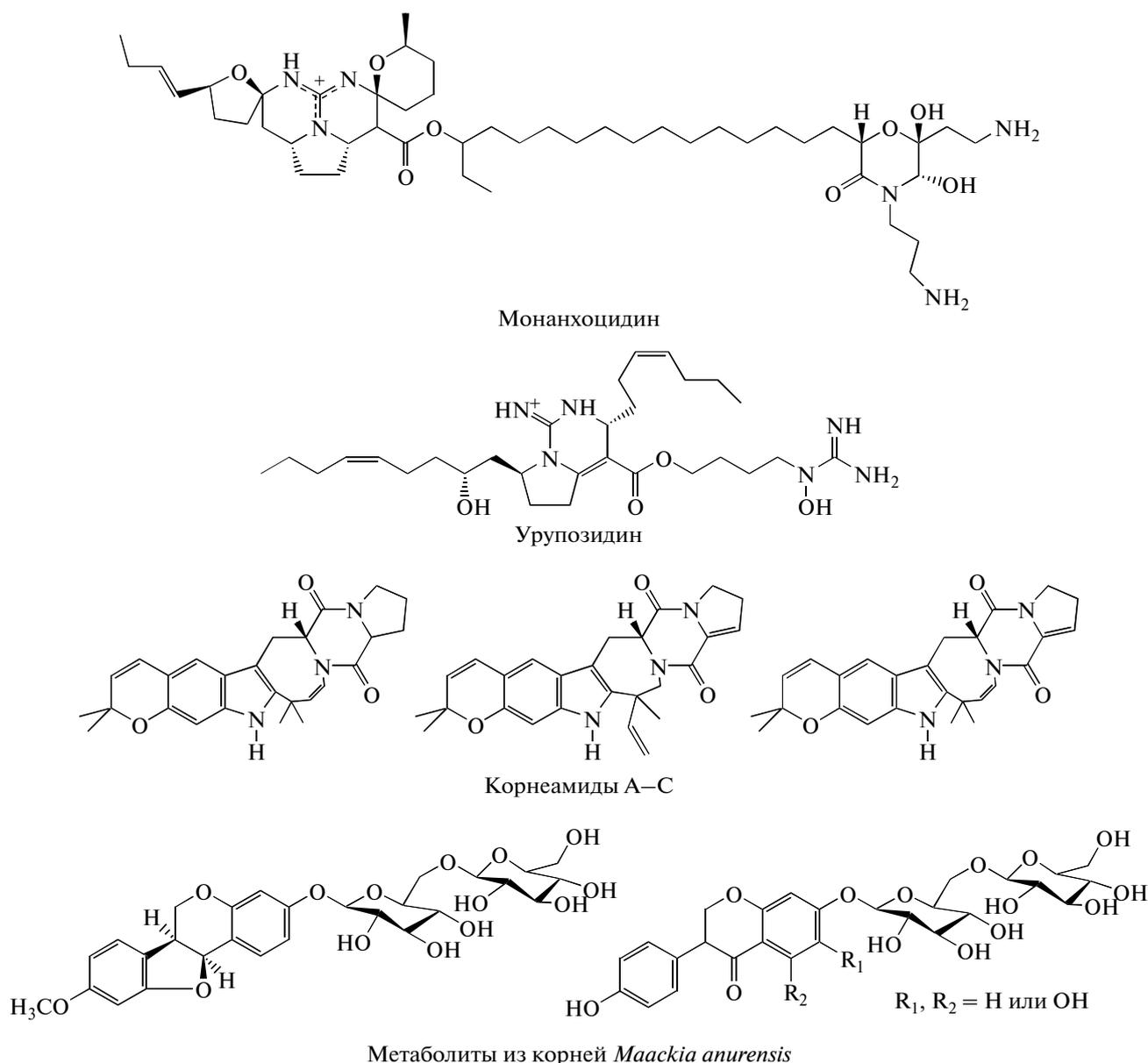


Рис. 1. Структуры природных соединений, полученных в последние годы в ТИБОХ им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

с учёными Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичёва ДВО РАН.

В последние годы поиск биологических источников новых природных соединений основывается не только на скрининге биологической активности полученных из них экстрактов, применяются и совершенно новые подходы. Один из них состоит в использовании секвенирования генов бактерий. Анализ нуклеотидных последовательностей позволяет предсказать, метаболиты какого химического класса могут быть выделены из соответствующих видов, а также могут ли эти бактерии найти биотехнологическое применение.

Совместно с сотрудниками Центра “Биоинженерия” РАН (Москва) выполнено полногеномное секвенирование морской флавобактерии *Mesonia alga* из нашей коллекции морских микроорганизмов. Было установлено, что бактерия является продуцентом целой серии новых ферментов класса гликозилтрансфераз. Вероятно, она может найти применение для гликозилирования различных субстратов. Есть надежда, что с помощью этой бактерии удастся получить новые природные соединения, обладающие той или иной биологической активностью. Полногеномное секвенирование выполняется уже и в лабораториях нашего института: первым стал геном бактерии *Vitellibacter vladivostokensis* (штамм КММ 3516Т).

В последние годы растёт интерес к так называемым экстремофильным организмам как продуцентам природных соединений. Такие организмы, главным образом бактерии, но не только они, найдены в самых экзотических местах обитания. Например, их обнаружили в подлёдных озерах Антарктиды, в многокилометровых впадинах океана, в горячих источниках при температурах, близких к температуре кипения воды, и даже в охлаждающих контурах ядерных реакторов на атомных электростанциях. Примером исследования экстремофилов является недавнее изучение нашими сотрудниками тритерпеновых гликозидов из голотурии *Kolga hyaline*, собранной коллегами из Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН в Арктике, в котловине Амундсена на глубине 4354 м. Это самый глубоководный биологический объект, из которого в результате совместных усилий дальневосточных химиков-биооргаников и московских биологов были выделены достаточно сложные природные соединения, а затем установлены их структуры [11]. Интересно, что полученные вещества близки по структуре к гликозидам, выделенным нами ранее из антарктических голотурий, собранных испанскими коллегами в ходе морской экспедиции на германском исследовательском ледоколе “Полярн Штерн”.

Совершенствуются и методы структурного анализа природных соединений, в особенности методы определения конфигураций асимметрических центров, обычно присутствующих в их молекулах. Всё чаще для решения этой проблемы применяют не только спектральную информацию и различные эмпирические правила, но и сравнение рассчитанных и наблюдаемых спектров и даже физических констант изучаемых веществ и их возможных изомеров. Результаты первых таких работ были недавно опубликованы нашими учёными при участии вьетнамских коллег [12]. Изучались терпеноиды из горгониевого коралла, собранного у берегов Вьетнама. После определения относительной стереохимии с использованием методов молекулярной динамики были отобраны все варианты наиболее стабильных ротомерных форм для возможных изомеров каждого из этих веществ. Затем методами квантовой химии рассчитаны их спектры дисперсии оптического вращения, ядерного магнитного резонанса и даже оптическое вращение оптических изомеров (энантиомеров). Сравнение расчётных данных с полученными для этих соединений спектрами и константами позволило определить абсолютную стереохимию всех трёх изученных терпеноидов [13].

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ДРУГИХ ПРЕПАРАТОВ

За 50-летнюю историю Института биоорганической химии ДВО РАН были получены несколько сотен патентов Российской Федерации и ав-

торских свидетельств СССР, а также патенты европейских стран и США. В настоящее время поддерживается около 100 патентов, значительная часть которых используется на собственном опытно-производстве, а также другими организациями и предприятиями. На основе многолетних фундаментальных исследований природных соединений в нашем институте были разработаны четыре лекарственных препарата, несколько других биопрепаратов и медицинских диагностикомов.

Медицинский препарат гистохром для кардиологии (раствор для внутривенного введения 1%) рекомендуется для уменьшения зоны некроза при остром инфаркте миокарда. Гистохром для офтальмологии (раствор для инъекций 0.02%) рекомендуется для лечения кровоизлияний в глаз различного происхождения (травмы, диабет, гипертония и т.п.). Оба лекарства выпускаются около 10 лет. Максар – эффективное гепатозащитное средство растительного происхождения, показано при токсическом и вирусном гепатитах и циррозе печени. В 2008 г. произведена первая опытно-промышленная партия. Лекарство выпускается небольшими партиями, организовать крупное промышленное производство до сих пор не удаётся. Коллагеназа КК – ферментативный ранозаживляющий и противоожоговый препарат, успешно использовался в ряде крупных клиник и госпиталях, длительное время находится на перерегистрации (рис. 2).

В последние два года уточнён молекулярный механизм действия препаратов серии гистохром, получены новые данные, указывающие на возможность расширения их медицинского применения. Часть работ выполнялась совместно с учёными из Медицинского колледжа Университета Инчэ (Республика Корея, Пусан). Было показано, что гистохром действует на митохондриальном уровне: он увеличивает митохондриальную массу, уровень вырабатываемого митохондриями АТФ и экспрессию митохондриальных ферментов. В опытах *in vivo* изученные препараты достоверно увеличивают мышечную выносливость, что позволяет совершать значительно больший объём физической работы [13]. Таким образом, кроме ранее найденных благоприятных эффектов, например, по рассасыванию гемофтальмов, гистохром обладает стимулирующим мышечную активность действием и может применяться для повышения работоспособности в экстремальных условиях.

В институте разработаны рецептуры хорошо известного в стране и за рубежом “Уссурийского бальзама” и горькой настойки “Золотой Рог” на основе элеутерококка. Четыре различных безалкогольных бальзама под общим названием “Гербамарин”, содержащие биоактивные вещества как наземного, так и морского происхождения, выпускаются с начала 2000-х годов на заводе ОАО “Уссурийский бальзам” в г. Уссурийске. Детокси-



Рис. 2. Лекарства и биопрепараты, разработанные в ТИБОХ им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

кант зостерин из морских трав в советские времена применялся работниками предприятий цветной металлургии по всей стране для профилактики отравлений тяжёлыми металлами, сейчас он известен под различными торговыми названиями, так же, как и содержащие его продукты. Ветеринарный препарат “КД” многие годы применялся в звероводстве для уменьшения потерь от так называемой алеутской болезни норки.

Биологически активные добавки к пище на основе полисахаридов дальневосточных бурых водорослей под общим названием фукалам (к ним относятся фукалам янтарный, фукалам экстра и др.) — выпускаются на Опытно-экспериментальном производстве ТИБОХ ДВО РАН. Там же разрабатываются и выпускаются продукты функционального питания, например, относящиеся к серии “Золотой Рог” — на основе приморского мёда и морских биологически активных веществ.

ЗАО “Вектор Бест” (Новосибирск) выпускает разработанный в нашем институте диагностикум для определения опухолевого маркера ТБГ. Другой набор, позволяющий диагностировать дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку (псевдотуберкулёз), применяется в основном медицинскими учреждениями Приморского края, в том числе Медобъединением ДВО РАН.

В институте активно ведётся разработка новых лекарств. В их числе инновационный медицинский препарат кумазид, содержащий в качестве биологически активной субстанции природные соединения одного из видов съедобных голотурий (трепангов). При пероральном введении в очень небольших дозах он проявляет иммуностимулирующие свойства, обратимо активируя транспорт кальция в иммунокомпетентных клетках [14]. Испытания на животных показали, что он защищает от бактериальных инфекций и радиации, уменьшает устойчивость опухолевых клеток к противоопухолевым лекарствам. На основании успешно завершённых доклинических исследований сделано заключение, что препарат относится к V классу опасности — “вещества практи-

чески нетоксичные”. Кумазид имеет слабовыраженные кумулятивные свойства, не оказывает токсического влияния на общее состояние, динамику массы тела, гемограмму, сердечно-сосудистую и центральную нервную системы, функциональное состояние печени и почек. Он не проявляет мутагенных свойств в тесте Эймса и не увеличивает спонтанного уровня хромосомных повреждений в клетках, не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием.

Были выполнены исследования фармакокинетики и фармакодинамики кумазида, оформлены опытно-промышленный регламент на производство, отчёт о патентных исследованиях, программа и методики испытаний его биологически активной субстанции, программа проведения клинических испытаний, выпущены опытные партии субстанции и препарата. Установлен молекулярный механизм действия кумазида и идентифицирована его молекулярная мишень — один из типов мембранных рецепторов в клетках иммунной системы. Ранее ни такой механизм действия, ни эта молекулярная мишень для иммуностимулирующих лекарств известны не были. Препарат готов к клиническим испытаниям, необходимы инвестиции.

Цель другого проекта — создание нового поколения препаратов серии гистохром. Разработана схема их полного синтеза, получена синтетическая биологически активная субстанция, оформлен опытно-промышленный регламент, наработана опытная партия для доклинических исследований. Кроме того, методами органического синтеза удалось получить водорастворимые производные активной субстанции, не уступающие по свойствам субстанции природного происхождения. Ведётся технологическая апробация всех стадий синтеза и наработка опытной партии одного из этих соединений. Применение такой субстанции открывает возможности создания более активного, чем гистохром, лекарства для инъекционного и перорального применения.

Ещё один проект, реализуемый совместно с Дальневосточным федеральным университетом, предполагает разработку препарата коурохитин — мазевой формы для лечения аллергических дерматитов и других кожных заболеваний. Были предложены два новых одностадийных способа синтеза алкалоида триптантрина (коуропитина). Создана мазевая композиция коурохитин 0.01%, содержащая дополнительную активную субстанцию — хитозан. Композиция показала высокую активность в испытаниях *in vivo* на моделях контактного дерматита. При этом обработка мазью приводила к уменьшению уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6) в сыворотке крови подопытных животных [15]. Препарат обладает также противомикробными, антиканцерогенными и противогрибковыми свойствами. Уже наработана опытная партия биоактивной субстанции, проводятся доклинические исследования.

Биологическая активность ещё некоторых открытых нами соединений стимулирует их дальнейшее изучение в качестве потенциальных лекарственных веществ. Например, лютеолин дисульфат из морской травы *Zostera marina* оказался более сильным антиоксидантом, чем дигидрокверцетин. Он обладает умеренным противовоспалительным действием, а на модели аллоксанового диабета превосходит по своему действию препарат сравнения глибенкламид [16].

Некоторые полярные стероиды из морских звёзд продемонстрировали нейропротекторные свойства на клетках мышины нейробластомы и на органотипической культуре срезов гиппокампа крыс [17]. Они увеличивали выживание этих клеток в условиях кислородного и глюкозного голодания (эти данные получены совместно с новосибирским Научно-исследовательским институтом молекулярной биологии и биофизики).

Высокоактивная щелочная фосфатаза из морской бактерии также представляет интерес в качестве возможного компонента лекарственных средств. Недавно в нашем институте был получен штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/40Pho — продуцент хорошо растворимой рекомбинантной щелочной фосфатазы (СтАР). Она перспективна как средство, способное дефосфатировать липид А в липополисахаридах грамотрицательных бактерий, уменьшая их токсический эффект при бактериальных инфекциях. Исследования фармакологической активности щелочной фосфатазы морской бактерии проводятся совместно с компанией “Инновационные фармакологические разработки” (г. Томск).

Одна из наших главных задач — поиск модельных соединений для последующего синтеза их производных и аналогов, то есть для получения библиотек соединений. Модельное природное соединение (так называемый “хит”, от англ. hit — попадание в цель) должно иметь необычную структуру и проявлять высокую биологическую

активность, а библиотека — открывать путь к отбору соединения-лидера для дальнейшей разработки на его основе лекарственного препарата. Недавно из губки *Neopetrosia* sp. мы выделили два необычных рибозида, отличающихся от всех ранее известных соединений этого типа конфигурацией гликозидной связи и наличием в рибозном остатке бензольного заместителя [18]. Один из этих рибозидов, неопетрозид А, который оказался митохондриальным активатором, был синтезирован нашими коллегами из Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (лаборатория члена-корреспондента РАН Н.Э. Нифантьева). Началась работа по получению библиотеки синтетических соединений на его основе.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Природа ещё не раз удивит нас структурами и свойствами новых малых молекул, в том числе соединений, которые могут быть использованы для создания лекарств. Их разнообразие — источник надежд и вдохновения химиков и фармакологов — остаётся недостаточно изученным. Действительно, только небольшая часть видов морских организмов побывала в руках химиков-биооргаников, причём в большинстве случаев к ним относятся виды, обитающие на небольших глубинах. Много не только неизученных, но и пока неизвестных науке видов морских беспозвоночных обитает на средних глубинах океана — от 800 до 1500 м. Научиться собирать такие организмы и идентифицировать их — актуальная задача для морских биологов и перспектива для тех, кто изучает биологически активные соединения морского происхождения.

Другая малоизученная группа организмов — различные микроорганизмы. Огромное их число из наземных и морских мест обитания не исследовано как биологические источники природных соединений просто потому, что их не научились культивировать. По мере решения этой проблемы появятся новые объекты исследований для тех, кто ищет противоопухолевые, противовирусные, противобактериальные и другие полезные вещества.

Из большинства ранее изученных биологических видов были выделены главным образом такие соединения, содержание которых выше 0.001% от сухого веса исходных экстрактов. Минорные метаболиты часто оставались неизвестными. В высших наземных растениях, а некоторые из них были изучены много лет назад и с тех пор не подвергались повторному исследованию, могут быть найдены новые минорные высокоактивные вещества, которые можно выделить с применением более совершенной техники и определить их структуры с помощью современных физико-химических методов.

Большие перспективы в изучении природных соединений открывают биотехнологические ме-

тоды. С помощью микроорганизмов, в том числе генетически изменённых, можно трансформировать известные природные соединения в такой же манере, как при промышленном микробиологическом синтезе кортикостероидов. Очевидно, что возможности такого подхода значительно шире, тем более, когда это касается смешанного культивирования с использованием консорциумов микроорганизмов. Генетические трансформации микроорганизмов могут сделать их продуцентами новых, пока не существующих в природе соединений.

Ферментативная биотехнология позволяет вводить в природные соединения те или иные функциональные группы — углеводные, фосфатные и др., а также осуществлять циклизацию, окисление, изомеризацию и другие их трансформации. Огромные возможности открывает и применение с этой целью каталитических антител — абзимов.

Органический синтез природных соединений и его сочетание с биотехнологическими методами может дать тысячи новых аналогов природных соединений и веществ, содержащих те или иные фармакофорные группы, ранее найденные в метаболитах растений, животных или микроорганизмов. Именно этот подход, основанный на использовании природных веществ-прототипов, не раз доказывал свою эффективность при создании новых лекарств и, несомненно, будет применяться снова и снова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Newman D.J., Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010 // *Journal of Natural Products*. 2012. V. 75. № 3. P. 311–335.
2. Tu Youyou. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine // *Nature Medicine*. 2011. V. 17. P. 1217–1220.
3. Crump A., Omura S. Ivermectin, Wonder drug' from Japan: the human use perspective // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2011. V. 87. P. 13–28.
4. Romanenko L.A., Tanaka N. et al. *Flavobacterium maris* sp. nov. isolated from shallow sediments of the Sea of Japan. // *Archives of Microbiology*. 2015. V. 197. № 7. P. 941–947; Romanenko L.A., Tanaka N. et al. *Rheinheimera japonica* sp. nov., a novel bacterium with antimicrobial activity from seashore sediments of the Sea of Japan. // *Archives of Microbiology*. 2015. V. 197. № 4. P. 613–620; Romanenko L.A., Tanaka N. et al. *Sphingorhabdus pacificus* sp. nov., isolated from sandy sediments. // *Archives of Microbiology*. 2015. V. 197. № 2. P. 147–153; Romanenko L.A., Tanaka N. et al. *Pseudomonas glareae* sp. nov., a marine sediment-derived bacterium with antagonistic activity // *Archives of Microbiology*. 2015. V. 197. № 5. P. 693–699; Nedashkovskaya O.I., Van Trappen S. et al. *Lutibacter holmesii* sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, and emended description of the genus *Lutibacter* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015. V. 65. Pt. 11. P. 3991–3996; Nedashkovskaya O.I., Van Trappen S. et al. *Winogradskyella litoriviva* sp. nov., isolated from coastal seawater // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015. V. 65. Pt. 10. P. 3652–3657.
5. Martins A., Vieira H., Gaspar H., Santos S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success // *Marine Drugs*. 2014. V. 12. № 2. P. 1066–1101.
6. Guzii A.G., Makarieva T.N. et al. Monanchocidin: a new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* // *Organic Letters*. 2010. V. 12. № 19. P. 4292–4295.
7. Makarieva T.N., Ogurtsova E.K. et al. Uruposidin A: a new, inducing iNOS expression bicyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* // *Organic Letters*. 2014. V. 16. № 16. P. 4292–4295.
8. Dyshlovoy S.A., Hauschild J. et al. Marine alkaloid Monanchocidin A overcomes drug resistance by induction of autophagy and lysosomal membrane permeabilization // *Oncotarget*. 2015. V. 16. № 19. P. 17328–17341.
9. Zhuravleva O.I., Afiyatulloev Sh.Sh. et al. Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus carneus* Blochwitz // *Phytochemistry*. 2012. V. 80. P. 123–131.
10. Кушнерова Н.Ф., Федорев С.А. и др. Гепатопротекторные свойства изофлавоноидов из корней *Maackia amurensis* при экспериментальном поражении печени четырёххлористым углеродом // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014. Т. 77. № 2. С. 26–30.
11. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I. et al. Kolgaosides A and B, two new triterpene glycosides from the Arctic deep water sea cucumber *Kolga hyalina* (Elasipodida: Elpidiidae) // *Natural Product Communications*. 2014. V. 9. P. 1259–1264.
12. Diep C.N., Lyakhova E.G. et al. Structures and absolute stereochemistry of guaiane sesquiterpenoids from the gorgonian *Menella woodin* // *Tetrahedron Letters*. 2015. V. 56. P. 7001–7004.
13. Seo D.Y., McGregor R.A. et al. Echinochrome A improves exercise capacity during short-term endurance training in rats // *Marine Drugs*. 2015. V. 13. P. 5722–5731.
14. Aminin D.L., Chaikina E.L. et al. Antitumor activity of the immunomodulatory lead Cumaside // *Int. Immunopharmacol.* 2010. V. 10. P. 648–654.
15. Попов А.М., Кривошанко О.Н., Артюков А.А. Сравнительная оценка фармакологической активности лютеолина и 7,3'-дисульфата лютеолина при моделировании разных патологий // *Биофармацевтический журнал*. 2011. № 4. С. 27–33.
16. Попов А.М., Кривошанко О.Н. и др. Лечебная активность препарата “Коурохин” при моделировании аллергического дерматита // *Биофармацевтический журнал*. 2015. № 3. С. 24–30.
17. Palyanova N.V., Pankova T.M. et al. Neurotogenic and neuroprotective effects of polar steroids from the Far East starfish *Patiria pectinifera* and *Distolasterias nipon* // *Marine Drugs*. 2013. V. 11. P. 1440–1455.
18. Shubina L.K., Makarieva T.N. et al. Pyridine nucleosides neopetrosides A and B from a marine *Neopetrosia* sp. sponge. Synthesis of neopetroside A and its β -riboside analogue // *Journal of Natural Products*. 2015. V. 78. P. 1383–1389.

НАУЧНАЯ СЕССИЯ ОБЩЕГО СОБРАНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ВЫСТУПЛЕНИЯ УЧАСТНИКОВ НАУЧНОЙ СЕССИИ
ОБЩЕГО СОБРАНИЯ РАН

DOI: 10.7868/S0869587316060190

ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ РАН
И.В. ВОЛОВИЧ

Я бы хотел сказать несколько слов об организации нынешней сессии и, может быть, будущих научных сессий.

Сегодня мы заслушали 15 научных докладов. Нет сомнения в том, что было рассказано о выдающихся результатах работы больших коллективов. Но 15 докладов — это, по-моему, слишком много, в этом потоке тонут многие важные вопросы. Поэтому предлагаю в будущем ограничить число докладов на научных сессиях, скажем, шестью до перерыва и тремя после перерыва.

Второе, о чём считаю нужным сказать: как-то не принято у нас стало обсуждать на общих собраниях научные проблемы. Думаю, нужно после каждого доклада в обязательном порядке предоставлять время для дискуссии и вопросов. Желательно, чтобы доклады были хотя бы в какой-то мере понятны коллегам других специальностей. Формат может быть, например, такой: 20 минут — доклад, 10 минут — обсуждение. Давайте попробуем превратить научные сессии в место для дискуссий.

ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ РАН
В.В. ВАСИЛЬЕВ

Мне по двум причинам пришлось внимательно знакомиться с научной составляющей программы нынешней сессии: во-первых, как член РАН, я обязан был это сделать, во-вторых, как клинический фармаколог, я кровно заинтересован в той части программы, которая посвящена научным основам эффективности и безопасности лекарственных средств. Именно безопасность и эффективность лекарственных средств — сфера моей деятельности.

Анализировать научную составляющую докладов я, скорее всего, не рискну. Широта и глубина научного поиска, фундаментальная составляющая представленных разработок впечатляют. Однако объективная реальность, воплощённая в Госпрограмме “Фарма-2020”, заставляет задуматься. Заложенные в ней показатели по инновационным лекарственным средствам, вне всякого сомнения, будут выполнены и даже перевыпол-

нены, но уж слишком малые сроки отведены на решение поставленных задач. Регламент или, как сейчас принято говорить, дорожная карта разработки нового, а тем паче инновационного лекарственного средства, увы, далеко выходит за обозначенные сроки. Значит, следует ориентироваться прежде всего на импортозамещение, то есть воспроизведение лекарственных средств. И здесь во всей полноте встаёт проблема качества и эффективности препаратов (с точки зрения клиники это в общем-то синонимы).

Возникает законодательная неопределённость. Путь воспроизведённых средств в клинику предполагает оценку биоэквивалентности на здоровых людях, иначе говоря, оценку терапевтической эквивалентности. Но вероятность достижения терапевтической эквивалентности чрезвычайно мала, поскольку это дело затратное, трудоёмкое и длительное. Я говорю об этом, потому что вижу здесь точки пересечения интересов наших объединившихся академий.

Терапевтический лекарственный мониторинг, который позволяет уменьшить затраты на оценку терапевтической эквивалентности, — вещь хорошая, но от клиники далёкая. Поиск и разработка технологий или инструментов для вывода её в рутинную клиническую практику — задача физиков, физиков-технологов, и кое-что в этом направлении делается. Разработка технологии оперативной оценки эффективности лекарственных препаратов крайне значима, она позволяет отойти от методов доказательной медицины с привлечением тысяч или десятков тысяч пролеченных пациентов к персональному пациенту. Например, если мы получим инструмент оценки, скажем, изменения реологических свойств крови, будет решена проблема оценки антикоагулянтов — от антиагригантов к антикоагулянтам и фибринолитикам. Но специалисты считают, что эта задача настолько тривиальна, что ею не имеет смысла заниматься.

Обозначенные мною подходы позволяют приблизиться к персонализированной медицине, хотя, конечно, они не могут заменить фармагеноетику и другие перспективные подходы, чуть открывая пациента как личность, освободив его от довлеющих моделей генетической либо метаболической паспортизации, если таковая дойдёт до клинической практики.

**ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ РАН
Н.Э. НИФАНТЬЕВ**

Сегодня неоднократно говорилось о том, что объединение трёх академий даёт уникальный шанс для серьёзных разработок на благо нашего здравоохранения. Это следует из выступления министра здравоохранения, которая выделила в качестве приоритетов разработку медико-биологических препаратов, диагностических средств и антиинфекционных агентов. Вот об этом я и хотел бы сказать несколько слов.

В институтах РАН сейчас действительно накоплен уникальный опыт создания импортозамещающих инновационных препаратов, в которых остро нуждается наше здравоохранение. Вероника Игоревна Скворцова сообщила, что в ближайšie полтора года будет проводиться аудит имеющихся разработок, будут определяться приоритеты. Думаю, однако, что мы достаточно компетентны, чтобы в этой аудитории обозначить национальные приоритеты и определить продукты, которые могут способствовать их реализации. Выделю два таких приоритета.

Первый — это конъюгированные углеводные вакцины. Наверное, не все знают, что большую часть национального календаря прививок составляет одна вакцина — пневмококковая, которая покупается за рубежом. Однако мы, химики, вместе с коллегами — бактериологами и иммунологами, в основном работающими в системе Академии наук, располагаем достаточным опытом, который позволяет создать отечественную пневмококковую вакцину. Следует иметь в виду, что стоимость этого продукта очень высока, фактически это половина стоимости всего нашего национального календаря прививок, а значит, крайне важно начать производить его в России.

Кроме того, мы располагаем компетенциями, которые позволяют создать вторую по важности отечественную углеводную вакцину — против гемофильной палочки типа Б. Это вакцина, которой должен быть защищён каждый новорождённый ребёнок. Сейчас это тоже целиком импортный продукт, и в рамках госзакупок на федеральном уровне мы получаем, по некоторым данным, только 25% нужного количества, остальное должны обеспечить местные власти, которые не располагают возможностью покрыть потребности. В то же время имеющиеся отечественные разработки позволяют в короткие сроки сделать уже не копию импортного продукта, а создать более эффективную вакцину нового поколения. Для этого у нас есть всё, включая методы получения компонентов, даже освоено производство вакцинного белка-носителя, который ранее не производился в нашей стране.

Сегодня министр говорила о необходимости разработки диагностикумов. В нашей микологи-

ческой практике использовались два диагностикума — оба продукты зарубежной компании. В 2014 г. эти препараты утратили регистрацию в России, и сейчас у нас в стране нет ни одного диагностикума для оперативного определения грибковых патогенов, а значит, невозможно оперативно определять стратегию лечения антибиотиками. В то же время такие продукты могут быть разработаны, причём достаточно быстро, объединёнными усилиями нескольких институтов нашей академии.

Хотелось бы, чтобы началось сотрудничество с Минздравом России, чтобы появился госзаказ на разработки, о которых я говорил, как и на другие приоритетные продукты для отечественного здравоохранения, список которых, без сомнения, уже должен быть подготовлен Минздравом.

ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ РАН С.М. ДЕЕВ

Мы прослушали интереснейшие доклады, в которых освещались самые разные области современной биомедицинской науки. Мне бы хотелось дополнить сказанное, упомянув одно важное направление, которое сформировалось в мировой науке в последние десятилетия, оно называется тераностика. Пока это не очень известный термин, под которым имеется в виду сочетание терапии и диагностики, одновременное наличие в одном препарате или в коктейле соединений возможности постановки диагноза и эффективного терапевтического воздействия.

Почему это важно? Если не установить вовремя молекулярную природу, например, раковых клеток, то лечение может быть не только неэффективным, но и опасным. Ведь безвредных лекарств не существует. Кстати, раковая клетка очень быстро меняется, поэтому в ходе лечения необходимо вести мониторинг эффективности воздействия.

За последние полтора десятилетия в 2500 раз возросло количество публикаций по тераностике. Признанный авторитет в этой области профессор Университета Калифорнии Деннис Матьюс (Dennis Matthews) в недавнем докладе оценил коммерческий рынок технологий, которые так или иначе связаны с тераностикой, в 50 млрд. долл. Думаю, мы в своих исследованиях тоже должны уделять внимание этому направлению. Тераностический подход предполагает сочетание адресной части молекулы (антитело, липид, пептид, который распознаёт патогенную клетку) и визуализирующего компонента, который сигнализирует об обнаружении такой клетки, позволяет установить её локализацию и идентифицировать патогенный очаг. Кроме того, он должен включать терапевтический компонент, и совсем хорошо, если к этому добавляется возможность внешнего воздействия — включение

или выключение в нужный момент действия лекарства. Сегодня это не фантастика. В нашей стране создана модульная платформа для сборки таких соединений из блоков: один блок — антители, второй, например, химиотерапевтическое или радиоактивное соединение, третий — флуоресцентная молекула или наночастица.

Таким путём можно создавать эффективные средства с оптимальной фармакокинетикой и фармакодинамикой, что важно, потому что часть новых препаратов, о которых сегодня говорилось, — это низкомолекулярные соединения. Время их полужизни в кровотоке очень мало вследствие клубочковой фильтрации: в почках есть поры, размер которых примерно 6.5 нанометра, и все соединения меньшего размера быстро вымываются через почки. Предложенная стратегия модульной сборки тераностических соединений позволяет решать и эти проблемы.

У нас в стране указанное направление эффективно развивается, получен ряд патентов, результаты приоритетных исследований публикуются в высокорейтинговых международных изданиях. Думаю, когда мы будем определять стратегию развития биомедицины, исследования по тераностике должны занять в этих исследованиях своё место.

ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ РАН Т.А. ГУСЬКОВА

У меня вызывает опасение тот факт, что на нынешней сессии я не услышала ни одного доклада о научных основах оценки безопасности лекарственных средств. Но всем понятно: для того чтобы впервые ввести препарат человеку, надо провести качественные доклинические исследования. И проблема состоит в том, что те доклинические исследования, которые достаточны для синтетических лекарственных средств, абсолютно недостаточны для биотехнологических лекарственных препаратов. Мне кажется, настало время разрабатывать научные основы оценки безопасности такого рода лекарственных средств. О важности этого направления свидетельствуют факты. Например, в Англии чуть не случилась трагедия при апробации нового препарата на основе моноклональных антител, который должен был использоваться при лечении ревматоидного артрита. Были проведены все доклинические испытания — на мышах, крысах, собаках и даже обезьянах. Но на первой фазе клинических исследований у волонтеров после введения препарата произошёл бурный выброс цитокинов, и людей удалось спасти с большим трудом. Сейчас в ходе клинических испытаний этот препарат вводится пациентам в значительно меньших дозах и не струйно, а путём капельного введения в течение часа.

Я хочу подчеркнуть, что сложилась неверная трактовка доклинического изучения безопасности лекарств. Ведь что такое безопасность? Это как раз соотношение терапевтической дозы и той дозы, которая способна вызвать нежелательные явления. Именно на стадии доклинического исследования нужно обнаружить возможные нежелательные последствия применения того или иного препарата. Сотрудничество молекулярных биологов, биохимиков, физиологов с лекарственными токсикологами могло бы создать для этого необходимые условия. Мне кажется, что Академии наук следует уделить этому вопросу самое пристальное внимание.

АКАДЕМИК РАН А.Я. САМУЙЛЕНКО

Я хотел бы привлечь внимание к чрезвычайно актуальному вопросу повышения вирулентности патогенов в связи с колоссальными изменениями, происходящими на Земле, включая увеличение численности населения, животных, скорости передвижения, количества перемещающихся людей и животных. В результате многократно возрастает число контактов между макро- (человек, животные, птицы) и микроорганизмами (вирусы, бактерии). Поэтому действенность биопрепаратов, которые раньше были очень эффективными, резко снижается, а значит, нужно повышать их иммуногенность. То есть вопрос состоит не только в импортозамещении.

Ещё одна важная проблема — мутационные нагрузки, которые имеют своим следствием различные патологии, в том числе раковые образования. В 2011 г. Геннадий Алексеевич Романенко поддержал и утвердил на Президиуме РАСХН концепцию увеличения производства экологически чистой сельскохозяйственной продукции растительного и животного происхождения с помощью биопрепаратов и улучшения экологии, что уменьшит мутационные нагрузки. Этот подход можно использовать не только в агропромышленном производстве, у него есть перспективы очень широкого применения в народном хозяйстве.

В России вопрос загрязнения окружающей среды стоит очень остро. Поэтому надо говорить о сооружении локальных и городских систем биологической очистки сточных вод, функционирующих на основе управления сложными биоценозами, которые получены с помощью клеточной и генной инженерии, которые снижают и исключают мутационную нагрузку на почвенные и водные объекты (малые, средние и крупные реки России), а также позволяющие получать из агропромышленных отходов ценные экологически чистые продукты, используемые в полеводстве, животноводстве, птицеводстве, рыбоводстве. Нами разработаны комплексные промышленные инно-

вационные биотехнологии, обеспечивающие безопасность и эффективность животноводства и птицеводства.

Следует иметь в виду, что, по прогнозам, к 2070 г. на Земле не останется первозданной воды, которая ещё не подвергалась воздействию человека. Нужно более серьёзно подходить к этому вопросу, ведь то, что течёт в наших реках и озёрах, течёт и в наших сосудах, создавая мутационные нагрузки на наш организм.

Таким образом, для профилактики онкологических и других заболеваний человека и животных необходимо с помощью биопрепаратов, полученных на предприятиях биологической промышленности, решить следующие основные задачи:

- получать в достаточном количестве экологически чистые продукты питания;
- повышать усвояемость продуктов питания человеком, животными, растениями;
- повышать эффективность методов и средств борьбы с инфекционными и хроническими заболеваниями;
- не допускать выбросов в атмосферу и сброса в водные объекты мутационно загрязняющих веществ;
- получать экологически чистые продукты из промышленных отходов.

Эти актуальные для всего человечества проблемы должны решаться в том числе и учёными РАН.

АКАДЕМИК РАН Ю.В. ЦВЕТКОВ

На меня, неспециалиста в этом вопросе, заслушанные доклады произвели глубокое впечатление. Они свидетельствуют, что академическая наука располагает огромными возможностями для решения поставленных перед нами задач. Кроме того, Научная сессия показала, сколь важная роль в обеспечении эффективности и безопасности лекарственных средств принадлежит химии и Отделению химии и наук о материалах РАН.

Академик В.Н. Чарушин впечатляюще показал путь лекарственного препарата от пробирки до промышленного выпуска и возможность этого в наших условиях. Однако наши многочисленные аптеки торгуют почти исключительно импортом, отечественная продукция не рекламируется по телевидению. Это первое.

Второе. Я хотел бы обратиться к руководству Минздрава России в лице члена-корреспондента нашей академии В.И. Скворцовой. Нужно понимать, что научные работники – это особая социальная категория. Для настоящих учёных не существует нормированного рабочего дня. Мои сотрудники, например, и по субботам выходят на работу, ездят в командировки на вредные производства и так далее. А значит, нам необходимо обеспечить достойное медицинское обслужива-

ние. И раньше всё это было, но сейчас, по-видимому, подлежит разрушению. Министерство должно обратить на это внимание. Нам, академикам и членам-корреспондентам РАН, предлагают перейти в Четвёртое управление. Но это выглядит не очень красиво, проводится грань между нами и остальными научными работниками. Спрашивается, что я стою без учеников и соратников? Наши сотрудники получают мизерную зарплату, которая несопоставима с зарплатой газетного киоскера. Членам академии стипендия повышена вдвое, а у наших сотрудников зарплата осталась на прежнем уровне. Как я выгляжу перед своими учениками?

И последнее. Здесь много говорилось о том, что надо обеспечить демографическое развитие страны, говорилось о здоровье и окружающей среде. Но для нас не менее важный фактор – питательные традиции народа, никуда от этого не денешься. В таком случае надо обеспечить условия хотя бы для того, чтобы люди пили доброкачественные напитки. А у нас сплошь и рядом травят людей суррогатом. Думаю, мы должны попросить члена-корреспондента РАН В.И. Скворцову при поддержке ведущих медиков выступить с инициативой введения государственной монополии на производство и продажу алкоголя, как поступал своё время царь-батюшка. Тогда монополия обеспечивала треть доходов казны, и люди пили хорошую водку.

АКАДЕМИК РАН Н.А. КОЛЧАНОВ

Я хотел бы выразить удовлетворение тем, что эта Научная сессия состоялась. Не так давно, 4 декабря 2015 г., в новосибирском Академгородке также проходила Научная сессия, посвящённая созданию новых лекарственных средств, на которой было уделено пристальное внимание клеточным технологиям лечения социально значимых заболеваний.

В Сибирском отделении РАН в этой области работают несколько институтов: Институт цитологии и генетики, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Институт клинической и экспериментальной лимфологии, Институт клинической иммунологии в Новосибирске, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга в Томске и ряд других. Важное место в деятельности этих институтов занимают вопросы разработки новых подходов к созданию фармакологических препаратов на основе полинуклеотидов и их аналогов.

Интенсивные исследования в этом направлении ведут институты химического профиля, в частности, Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, в котором изучается возможность создания лекарств на основе биологически активных субстанций рас-

тительного происхождения. В Институте химии твёрдого тела и механохимии СО РАН анализируется роль кристаллической упаковки биологически активных субстанций в связи со специфической биологической активностью.

SPF-виварий, действующий на базе Института цитологии и генетики СО РАН, обеспечивает возможность трансляционных фармакологических исследований и проведения доклинических испытаний, в настоящее время он оперирует более чем 60 линиями генетических моделей патологий человека.

Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера совместно с клиницистами проводит исследования по бор-нейтрон-захватной терапии, а институты медицинского профиля – НИИ терапии и профилактической медицины в Новосибирске и НИИ медицинской генетики в Томске – изучают полиморфизм генов, ассоциированный с заболеваниями. Эти исследования очень важны не только для правильной и точной диагностики, но и для оптимизации лекарственной терапии заболеваний.

В целом прошедшая в Новосибирске сессия показала, что институты новосибирско-томского кластера фактически впервые осуществили инвентаризацию исследований двух академий – РАН и РАМН. Сессия убедительно продемонстрировала имеющийся в институтах самый широкий набор компетенций, позволяющий проводить полный цикл исследований по поиску фармакологических решений, включая расчёт взаимодействующих структур и лекарственных веществ, химический синтез белковых препаратов и препаратов на основе антител и химических структур, их проверку в рамках трансляционной фармакологической схемы на широком спектре моделей – мышах и крысах, рыбах (Данио-рерио, вид пресноводных лучепёрых рыб семейства карповых) и других животных – и завершать цикл клиническими испытаниями.

Я полагаю, учитывая все организационные неудобства и сложности процесса объединения, что сама динамичная, быстроразвивающаяся жизнь заставляет нас искать пути объединения усилий, и это, безусловно, положительный момент. В качестве предложения хотелось бы рекомендовать издание трудов нынешней Научной сессии в виде книги, включив в неё доклады, представленные на аналогичных сессиях в Сибирском, Дальневосточном и Уральском отделениях. Таким образом будет обозначена наша консолидированная позиция по отношению к современным вызовам, связанным с фармакологией.

АКАДЕМИК РАН М.И. КУЗЬМИН

Мне бы хотелось обратиться к членам РАН: нужно понимать, насколько тяжёлое сейчас вре-

мя для нашей академии. Приведу две цитаты Владимира Ивановича Вернадского, который в 1914 г. написал историю Российской академии наук: “Петербургская академия заняла одно из первых мест в ряду мировых научных учреждений. Это место она пытается сохранить, несмотря на то, что за столько времени коренным образом изменилось научное сообщество”. И далее: “У нашей Российской академии были тяжёлые моменты, но никогда в этот период упадка не исчезала из её жизни старая традиция, и она ярко сказывалась при возрождении. Это неизменная, непрекращающаяся традиция высоких идеалов жизни и деятельности позволяла ей выходить невредимой из испытаний”. Академия всегда занималась наукой и всегда помогала государству и поддерживала российскую государственность. В настоящий момент мы призываем к единству всё наше академическое сообщество.

Сибирское отделение РАН приняло обращение к высшему руководству Российской Федерации, которое мы передаём Президиуму нашей академии.

«Высшему руководству Российской Федерации.

Президенту России В.В. Путину.

К Вам обращаются члены Российской академии наук, представители интеллектуальной научной элиты страны. Мы живём в непростое, трудное время, когда нашей стране навязывают комплекс внешнеполитических проблем, в которых Россия последовательно отстаивает право на проведение собственной политики, подчинённой интересам прежде всего нашего народа.

Такое положение в истории нашей страны не впервые, и всегда в тяжёлые для страны времена все слои нашего общества сплачивались вокруг руководства страны, морально и физически поддерживая его действия и политику. “На всём свете у России только два верных союзника – наша Армия и Флот”, – говорил Александр III. Мы добавляем – и наука.

Действительно, когда Россия оказывалась в изоляции, во враждебном окружении, её научные достижения резко возрастали. Достаточно вспомнить Вторую мировую войну, в годы которой российские учёные обеспечили на долгие годы вперёд прорывное положение нашей страны в области атомной энергетики, атомного вооружения, самолёто- и ракетостроения, то есть в тех областях, которые до сегодняшнего дня обеспечивают наше независимое положение в мире.

Текущий момент также требует единства и сплочённости общества и активного использования научного потенциала страны, особенно на тех направлениях, на которых мы оказались отрезанными от остального мира вследствие санкционного давления со стороны Запада. Этому, одна-

ко, препятствует сложившаяся после 2013 г. система научного двоевластия.

Академия наук, по сути дела, оказалась отстранённой от формирования научной политики. Её заменили структуры ФАНО, которые первоначально были ориентированы на управление академическим имуществом. Они перехватили рычаги управления научными организациями, хотя в силу своей некомпетентности не понимают смысла научного исследования.

Реальные результаты деятельности ФАНО: это резко возросшая бюрократическая «научная отчётность», это неуважительное отношение к руководству академических институтов при его ротации — не учитывается сложившаяся возрастная структура в научных учреждениях, это несоблюдение полномочий Академии наук и ФАНО и вторжение агентства в зону ответственности РАН, в частности, в формирование научной политики и определение направлений исследований, это, наконец, стремление реформировать академию путём объединения научных институтов самого разного профиля.

Учитывая сложную обстановку, сложившуюся вокруг нашей страны, необходимость консолидации всех сил общества, включая её исследовательский корпус, обращаемся к руководству страны с предложением о проведении совещания с членами РАН по вопросам восстановления самостоятельности Российской академии наук и обеспечения возможности для неё планировать фундаментальные исследования в стране.

Мы уверены, что, обретя независимость и самостоятельность, Академия наук сделает всё возможное для придания нашей стране авторитета великой не только военной, но и научной державы».

Это обращение, которое подготовили академики М.И. Кузьмин и В.В. Ярмолюк, поддержано

Сибирским отделением РАН. Мы договорились, что оно будет разослано всем членам академии. Сибирское отделение берёт это дело на себя. Мы уже собрали подписи в Сибирском отделении. Вчера мы были в Отделении наук о Земле и тоже собирали подписи, порядка 80 подписей уже есть. Если не все подпишут наше обращение, то будет указано, что столько-то членов академии поставили под этим документом свою подпись.

Реплика академика В.Е. Фортова: Все мы хорошо понимаем, что проблема есть, и она обостряется. Мы этот вопрос ставили на Совете по науке и образованию при Президенте РФ, который проходил в Эрмитаже. Президент озабочен этой ситуацией. В качестве первого шага по её преодолению была поддержана идея «двух ключей», чтобы поработать определённое время в таком режиме: «два ключа» плюс временный запрет на распоряжение академической собственностью, плюс некоторое торможение процесса реструктуризации.

Сегодня ситуация складывается неоднозначно. Есть позиции, по которым мы не находим понимания ФАНО. Есть позиции, по которым мы можем договориться, например, процедура подготовки регламентов в отношении некоторых из них работает.

Есть предложение принять к сведению это обращение. Оно продиктовано благими намерениями. Даю вам слово, что на ближайшем заседании президиума Совета по науке и образованию я поставлю этот вопрос. А когда через три месяца (в марте) мы будем проводить отчётное Общее собрание РАН, все эти вопросы надо будет обсудить. Тогда можно будет провести дискуссию с учётом того, что до этого собрания пройдёт Совет по науке и образованию, где нам, видимо, придётся усилить правило «двух ключей», сделав его юридически обязательным.

**ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ СЛОВО ПРЕЗИДЕНТА РАН
АКАДЕМИКА В.Е. ФОРТОВА**

DOI: 10.7868/S0869587316060037

Уважаемые коллеги, должен сказать, что сегодня мы с вами проделали большую работу. Я благодарю всех участников Научной сессии, представленные доклады были очень интересными, позволили по-новому взглянуть на широкий круг проблем, связанных с созданием, апробацией и производством современных лекарственных средств.

Не будет преувеличением сказать, что объединённый формат наших трёх академий начинает давать первые результаты. Причём самое главное, что это научные результаты, а не бюрократическая перестановка стульев. Сегодня стало понятно, какими вопросами занимаются наши коллеги и какими вопросами мы теперь будем заниматься вместе. Это очень важно.

Мне остаётся только поблагодарить всех тех, кто затратил много сил, времени и труда на подготовку и проведение этой сессии, разработку её научной программы, которая, кстати, не ограничивается сегодняшним заседанием. Пройдут ещё два симпозиума по конкретным темам, на которых специалисты обсудят интересующие их перспективные проблемы.

Я хотел бы выразить особую благодарность академикам М.А. Пальцеву, А.И. Григорьеву, И.И. Дедову, В.И. Стародубову и многим-многим другим нашим коллегам, без заинтересованного участия которых вряд ли удалось бы провести столь содержательное обсуждение тем, которые чрезвычайно актуальны для каждого из нас и для всей страны, особенно в непростых нынешних условиях.

**ПОСТАНОВЛЕНИЕ НАУЧНОЙ СЕССИИ ОБЩЕГО СОБРАНИЯ РАН
“НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ”**

DOI: 10.7868/S0869587316060189

Лекарственное обеспечение населения является одной из основ национальной безопасности и мировой конкурентоспособности России, совершенствование которого требует развития фундаментальных фармакологических исследований и фармацевтических разработок, усиления взаимодействия научных, клинических и производственных структур. Фундаментальные исследования в области фармакологии определяют инновационный вектор развития фармацевтической промышленности в качестве важной составляющей национальной технологической инициативы, способствуют формированию глобального технологического паритета России, экономически обоснованному соотношению отечественных и импортных лекарств на российском рынке.

На Научной сессии Общего собрания членов РАН представлены доклады, освещающие достижения отечественной фундаментальной науки в области разработки новых оригинальных лекарственных средств и демонстрирующие современную методологию моделирования и создания таких лекарств. Отмечено, что разработка новых лекарств является межведомственной проблемой, требующей участия специалистов фармакологов, химиков, биотехнологов, токсикологов, фармацевтов, клинических специалистов разных направлений медицины, экспертов в области социальных проблем и экономики. Именно Российская академия наук как единственная государственная организация, объединяющая специалистов с наиболее высоким уровнем знаний, призвана играть решающую роль в комплексном развитии фармацевтической отрасли.

Российская академия наук придаёт важное значение интеграции фундаментальной и прикладной науки, широкому использованию результатов научных исследований для создания инновационных технологий и техники, соответствующих мировому уровню, продвижению результатов работы научных организаций, подведомственных Федеральному агентству научных организаций (ФАНО России), научно-методическое руководство которыми осуществляет РАН.

В научных организациях, подведомственных ФАНО России, находящихся под научно-методи-

ческим руководством РАН, в учреждениях других ведомств сосредоточен уникальный научно-технологический потенциал, основанный на традициях отечественных научных школ, который способен вывести российские разработки на мировой уровень.

Учитывая предложения, высказанные в ходе обсуждения на Научной сессии, Общее собрание членов РАН ПОСТАНОВЛЯЕТ:

1. Одобрить направления научных исследований, проводимых в институтах разных ведомств, в области решения фундаментальных вопросов разработки эффективных и безопасных лекарственных средств.

2. Считать целесообразным обратиться в Правительство Российской Федерации с предложением о дополнении Федеральной целевой программы “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации до 2020 года и дальнейшую перспективу” блоком “Поисковые фундаментальные исследования в создании отечественных инновационных лекарственных средств”.

3. Поручить академикам-секретарям отделений РАН по областям и направлениям науки усилить взаимодействие учёных, проводящих исследования в области разработки лекарственных средств, с заинтересованными федеральными органами исполнительной власти по вопросам создания и применения эффективных и безопасных лекарственных средств.

4. Считать необходимым организовать междисциплинарный Научный совет РАН по вопросам фармакологии с целью: проведения комплексного анализа состояния научных исследований в стране и за рубежом в области создания эффективных и безопасных лекарственных средств, оценки конкурентоспособности России на мировом рынке, усиления координации научных исследований в этом направлении; осуществления мониторинга новых технологий и лекарственных средств с точки зрения появления вызовов новых угроз и рисков.

5. Поручить отделениям РАН по областям и направлениям науки и региональным отделениям РАН подготовить предложения по модерниза-

ции и совершенствованию инфраструктуры обеспечения научной и научно-технической деятельности научных организаций, подведомственных ФАНО России, находящихся под научно-методическим руководством РАН и занимающихся разработкой лекарственных средств, для представления их в ФАНО России. Координацию работ по анализу и структурированию этих предложений возложить на вновь создаваемый Научный совет РАН по вопросам фармакологии.

6. Рекомендовать заинтересованным отделениям РАН по областям и направлениям науки и региональным отделениям РАН: ориентировать исследователей в области создания эффективных и безопасных лекарственных средств на реализацию полного инновационного цикла – фундаментальные исследования, доклинические и клинические исследования, регистрация препаратов в России, серийное производство, реализация в России и за рубежом и применение в практике здравоохранения; совместно с Президиумом РАН обратить внимание на меры по развитию механизмов взаимодействия государства и бизнеса, включая различные модели государственно-частного партнёрства и другие формы привлечения частного капитала для развития инфраструктуры здравоохранения.

7. Поручить Отделению общественных наук РАН совместно с Отделением медицинских наук РАН, Отделением химии и наук о материалах РАН, Отделением физиологических наук РАН разработать критерии оценки деятельности для научных организаций, выполняющих исследования по разработке новых лекарственных средств, учитывающие медицинское значение созданных оригинальных лекарств.

8. Рекомендовать ФАНО России дополнить приказ Федерального агентства научных органи-

заций от 16 июня 2015 г. № 19н “Об утверждении показателей эффективности деятельности федеральных государственных бюджетных учреждений, подведомственных Федеральному агентству научных организаций, и критериев оценки эффективности работы их руководителей, условий осуществления выплат стимулирующего характера руководителям федеральных государственных бюджетных учреждений, подведомственных Федеральному агентству научных организаций” позициями по инновационной деятельности научных организаций, занимающихся разработкой лекарственных средств, с включением в критерии оценки показателей выполнения основных этапов фармакологических разработок по созданию оригинальных лекарств.

9. Считать целесообразным обратиться в Министерство здравоохранения РФ с предложением о необходимости формирования комплексной национальной сети химико-биологического скрининга биологически активных веществ как основы создания отечественных инновационных лекарств.

10. Поручить Научно-издательскому совету РАН совместно с рабочей группой по подготовке Научной сессии Общего собрания членов РАН “Научные основы создания эффективных и безопасных лекарственных средств” подготовить материалы Научной сессии для издания в виде отдельного сборника.

*Президент РАН
академик РАН В.Е.ФОРТОВ*

*Главный учёный секретарь
Президиума РАН
академик РАН М.А.ПАЛЬЦЕВ*

ОФИЦИАЛЬНЫЙ
ОТДЕЛ

ПРЕЗИДИУМ РАН РЕШИЛ

(декабрь 2015 г.—январь 2016 г.)

• Присвоить звание “профессор РАН”:

по Отделению наук о Земле РАН – доктору технических наук **Т.Н. Александровой** (Национальный минерально-сырьевой университет “Горный”); доктору географических наук **А.Н. Бешенцеву** (Байкальский институт природопользования СО РАН); доктору биологических наук **А.В. Боброву** (МГУ им. М.В. Ломоносова); доктору геолого-минералогических наук **А.Ю. Бычкову** (МГУ им. М.В. Ломоносова); доктору физико-математических наук **Е.М. Володину** (Институт вычислительной математики РАН); доктору технических наук **О.В. Вшивковой** (Московский государственный университет геодезии и картографии); доктору географических наук **Е.Ж. Гармаеву** (Байкальский институт природопользования СО РАН); доктору геолого-минералогических наук **Д.П. Гладкочубу** (Институт земной коры СО РАН); доктору биологических наук **Е.А. Головацкой** (Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН); доктору геолого-минералогических наук **Д.В. Гражданкину** (Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН); доктору физико-математических наук **А.С. Грицуну** (Институт вычислительной математики РАН); доктору географических наук **Д.Ю. Гузиной** (МГУ им. М.В. Ломоносова); доктору физико-математических наук **И.И. Диденкуловой** (Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева); доктору физико-математических наук **А.В. Елисееву** (Институт физики атмосферы им. А.М. Обухова РАН); доктору технических наук **В.А. Ерёмченко** (Институт комплексного освоения недр РАН); доктору технических наук **Э.С. Закирову** (Институт проблем нефти и газа РАН); доктору геолого-минералогических наук **Д.А. Зедгенизову** (Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН); доктору технических наук **И.М. Индрупскому** (Институт проблем нефти и газа РАН); доктору технических наук **О.И. Казанину** (Национальный минерально-сырьевой университет “Горный”); доктору геолого-минералогических наук **А.А. Кирдяшкину** (Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН); доктору геолого-минералогических наук **И.В. Коровникову** (Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН); доктору геолого-минералогических наук **А.В. Корсакову** (Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН); доктору геолого-минералогиче-

ских наук **С.В. Кривовичеву** (Санкт-Петербургский государственный университет); доктору геолого-минералогических наук **И.Ю. Кулакову** (Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН); доктору географических наук **С.В. Левыкину** (Институт степи УрО РАН); доктору геолого-минералогических наук **Е.Ф. Летниковой** (Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН); доктору геолого-минералогических наук **К.Д. Литасову** (Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН); доктору медицинских наук **В.А. Мальчевскому** (Тюменский научный центр СО РАН); доктору технических наук **А.Е. Майорову** (Институт угля СО РАН); доктору геолого-минералогических наук **Д.В. Метёлкину** (Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН); доктору геолого-минералогических наук **П.С. Микляеву** (Институт геоэкологии им. Е.М. Сергеева РАН); доктору геолого-минералогических наук **С.В. Наугольных** (Геологический институт РАН); доктору физико-математических наук **М.А. Носову** (МГУ им. М.В. Ломоносова); доктору технических наук **М.В. Нырцову** (Московский государственный университет геодезии и картографии); доктору технических наук **А.Р. Оганову** (Сколковский институт науки и технологий); доктору геолого-минералогических наук **И.В. Пекову** (МГУ им. М.В. Ломоносова); доктору геолого-минералогических наук **Т.К. Пинегиной** (Институт вулканологии и сейсмологии ДВО РАН); доктору физико-математических наук **И.А. Репиной** (Институт физики атмосферы им. А.М. Обухова РАН); доктору геолого-минералогических наук **О.Г. Сафонову** (Институт экспериментальной минералогии РАН); доктору физико-математических наук **В.А. Семёнову** (Институт физики атмосферы им. А.М. Обухова РАН); доктору физико-математических наук **А.Л. Собисевичу** (Институт физики Земли им. О.Ю. Шмидта РАН); доктору физико-математических наук **А.А. Соловьёву** (Геофизический центр РАН); доктору геолого-минералогических наук **А.В. Соловьёву** (ОАО “Росгеология”); доктору физико-математических наук **Г.М. Стеблову** (Институт физики Земли им. О.Ю. Шмидта РАН); доктору физико-математических наук **И.Э. Степановой** (Институт физики Земли им. О.Ю. Шмидта РАН); доктору физико-математических наук **Ю.П. Стефанову** (Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН); док-

тору физико-математических наук **Р.Ю. Тарakanову** (Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН); доктору физико-математических наук **С.А. Тихоцкому** (Институт физики Земли им. О.Ю. Шмидта РАН); доктору технических наук **И.В. Ткаченко** (Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, СПб филиал); доктору технических наук **Т.Н. Чимитдоржиеву** (Институт физического материаловедения СО РАН); доктору физико-математических наук **Н.М. Шапиро** (Парижский институт физики Земли); доктору геолого-минералогических наук **А.Ф. Шацкому** (Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН);

по Отделению историко-филологических наук РАН – доктору исторических наук **Е.В. Алексеевой** (Институт истории и археологии УрО РАН); доктору филологических наук **Е.Л. Березович** (Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина); доктору филологических наук **С.А. Бурлак** (Институт востоковедения РАН); доктору филологических наук **Н.П. Гринцеру** (Российская академия народного хозяйства и государственной службы при Президенте РФ “Институт общественных наук”); доктору исторических наук **Е.С. Данилко** (Институт этнологии и антропологии им. Н.Н. Миклухо-Маклая РАН); доктору филологических наук **А.С. Десницкому** (Институт востоковедения РАН); доктору исторических наук **А.Е. Загребину** (Удмуртский институт истории, языка и литературы УрО РАН); доктору филологических наук **В.В. Казаковской** (Институт лингвистических исследований РАН); доктору исторических наук **Д.С. Коробову** (Институт археологии РАН); доктору исторических наук **А.И. Кривошапкину** (Институт археологии и этнографии СО РАН); доктору исторических наук **М.А. Липкину** (Институт всеобщей истории РАН); доктору филологических наук **М.Ю. Люстрову** (Институт мировой литературы им. А.М. Горького РАН); доктору филологических наук **А.А. Панченко** (Институт русской литературы (Пушкинский Дом) РАН); доктору филологических наук **Д.М. Савинову** (Институт русского языка им. В.В. Виноградова РАН); доктору исторических наук **К.А. Соловьёву** (Институт российской истории РАН); доктору исторических наук **П.С. Стефановичу** (Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”); доктору исторических наук

А.С. Усачёву (Российский государственный гуманитарный университет “Историко-архивный институт”); доктору филологических наук **Ф.Б. Успенскому** (Институт славяноведения РАН); доктору исторических наук **О.В. Хавановой** (Институт славяноведения РАН); доктору исторических наук **И.А. Христофорову** (Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”); доктору исторических наук **А.В. Черных** (Пермский научный центр УрО РАН).

• Утвердить состав Комиссии РАН по разработке рекомендаций об объёме средств, предусматриваемых в федеральном бюджете на очередной финансовый год на финансирование фундаментальных и поисковых научных исследований, проводимых научными организациями и образовательными организациями высшего образования, и о направлениях их расходования.

Состав комиссии: академик РАН **В.И. Стародубов** – председатель; академик РАН **М.А. Пальцев** – заместитель председателя; доктор экономических наук **С.И. Черных** (Институт проблем развития науки РАН) – учёный секретарь; академик РАН **М.П. Егоров**; доктор экономических наук **В.В. Иванов** (заместитель президента РАН); академики РАН **Н.И. Иванова**, **В.В. Ивантер**, **В.В. Козлов**; член-корреспондент РАН **Л.Э. Миндели**; академик РАН **А.Д. Некипелов**; доктор экономических наук **С.Е. Прокофьев** (Федеральное казначейство, по согласованию); академики РАН **Т.Я. Хабриева**, **В.А. Черешнев**; доктор экономических наук **В.И. Щедров** (Государственный научно-исследовательский институт системного анализа Счётной палаты РФ, по согласованию).

• Утвердить члена-корреспондента РАН **Д.В. Бисикало** главным редактором “Астрономического журнала” РАН с 22 декабря 2015 г. сроком на пять лет.

• Освободить академика РАН **В.В. Костюка** от обязанностей председателя Экспертной комиссии по золотой медали за выдающиеся достижения в области пропаганды научных знаний. За активную и плодотворную работу на этом посту объявить Валерию Викторовичу Костюку благодарность.

Председателем комиссии утвердить академика РАН **М.А. Пальцева**.

Сдано в набор 17.03.2016

Офсетная печать

Подписано к печати 20.04.2016

Усл. печ. л. 12.0

Тираж 287 экз.

Дата выхода в свет 25.04.2016

Усл. кр.-отт. 3.6 тыс.

Зак. 29

Уч.-изд. л. 11.9

Цена свободная

Формат 60 × 88¹/₈

Бум. л. 6.0

Свидетельство о регистрации № 0110150 от 04.02.93 г. в Министерстве печати и информации Российской Федерации

Учредители: Российская академия наук, Президиум РАН

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90

Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”

Отпечатано в ППП «Типография “Наука”», 121099 Москва, Шубинский пер., 6