

А.А. Мамчур
І.О. Лісняк
Н.Л. Новиченко

Інститут експериментальної
патології, онкології
та радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова:

фотоімунокон'югати,
фотодинамічна спрямована
(таргетна) терапія, фактор
росту ендотелію судин,
фотосенсибілізатор, апоптоз.

ФОТОАКТИВНІ КОН'ЮГАТИ ДЛЯ СПРЯМОВАНОЇ ПРОТИПУХЛИННОЇ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ

Резюме. В огляді проаналізовані дані щодо застосування фотодинамічної цілеспрямованої (таргетної) терапії та можливості її використання з метою пригнічення росту та розвитку пухлин. Також акцентована увага на застосуванні фотоімунокон'югатів з різними можливими носіями — біологічно активними речовинами: антитілами, цитокінами, ліпосомами, альбуміном, гормонами.

Останніми роками в онкологічну практику увійшов малотравматичний метод лікування при злоякісних новоутвореннях — фотодинамічна терапія (ФДТ). Метод полягає у введенні в організм з пухлиною фотосенсибілізаторів, які можуть накопичуватися в злоякісних клітинах, робити їх світлочутливими, зумовлюючи цим самим і вибіркоче руйнування малігнізованих клітин при наступному опроміненні. Запропонований спосіб терапії дозволяє очікувати значно більшої вибіркочості пошкодження пухлин порівняно з радіо- та хіміотерапією; це пояснюється, перш за все, тим, що фотосенсибілізатор здатний більше накопичуватися та довше затримуватися в пухлині порівняно з нормальними тканинами. Однак, значною мірою накопичення багатьох із таких сполук виявляли і в нормальних тканинах. Відсутність високоефективної селективності в накопиченні фотосенсибілізаторів пухлинами спонукала дослідників до пошуку нових підходів ФДТ, які б забезпечували якщо не селективне накопичення пухлинами фотосенсибілізуючих агентів, то ефективну їх «досилку» до пухлинних тканин.

Поштовхом до розробок таких підходів стала в 1980 р. робота D. Mew і співавторів [1]. Було показано, що гематопорфірин у вигляді кон'югату зі специфічними до поверхневих антигенів пухлинних клітин антитілами накопичується в пухлинах у значно вищій мірі порівняно з вихідним фотосенсибілізатором. Ця робота в подальшому відкрила шлях, власне, до розвитку так званої цілеспрямованої (таргетної) фотодинамічної терапії, де в якості провідників до відповідних мішеней можуть використовуватися не тільки антитіла, але й цитокіни, фактори росту, їх рецептори тощо.

Останніми роками активно проводять дослідження, спрямовані саме на вивчення різноманітних аспектів цілеспрямованої ФДТ. Ці дослідження сконцентровані не тільки на пошуках нових класів фотосенсибілізуючих агентів, мішенями яких виступали б пухлинні клітини, але й на розробці методів цілеспрямованої доставки фотосенсибілізаторів власне до пухлин. Одним із перспективних способів такої

цілеспрямованої доставки до пухлин є селективна «досилка» фотосенсибілізуючих агентів у вигляді їх кон'югатів з біологічно активними речовинами, як то: ростові фактори, цитокіни, «homing» — пептиди, поліклональні та моноклональні антитіла (МкАТ) до специфічних поверхневих антигенних детермінант пухлинних маркерів (карциномембрональний антиген тощо), до рецепторів ростових факторів, білків адгезії і т. п.

Кон'югати фотосенсибілізаторів з антитілами.

Гематопорфірин (Гп) — найпоширеніший фотосенсибілізатор, який знайшов широке застосування у фотодинамічній терапії пухлин. Був одним із перших фотосенсибілізаторів, який кон'югували з біологічно активними речовинами [1]. Максимум поглинання знаходиться в межах 620–640 нм. При поглинанні хвилі даної довжини цей сенсibilізатор спроможний викликати біологічні ефекти в тканині пухлини на глибині 5 мм. Гп має здатність накопичуватися лише на поверхні клітини та у екстрацелюлярному матриксі. Але щоб покращити ефективність фотодинамічної терапії виникає необхідність у застосуванні препаратів, що забезпечують інтерналізацію Гп через клітинну мембрану. Цього ефекту можна досягти в разі використання кон'югованих МкАТ до пухлинних антигенів з означеними фотосенсибілізаторами. Так з цією метою були синтезовані фотоімунокон'югати з МкАТ I-mAbU36, I-mAb425 та I-mAbE48. Було виявлено, що в синтезованих фотоімунокон'югатах Гп зберігає свої фізико-хімічні властивості, максимум поглинання та здатність до утворення синглетного кисню. Цей же синтезований фотоімунокон'югат виявився стабільним в сироватці крові, мав оптимальну імунореактивність навіть в тих випадках, коли співвідношення фотосенсибілізатора та МкАТ складало лише <3. Напроти, кон'югати з більш високим молекулярним співвідношенням МкАТ — фотосенсибілізатор частково втрачали розчинність в водно-сольових середовищах. У дослідах *in vitro* відзначали інтерналізацію клітинами лінії A431 Гп, кон'югованого з антитілами I-MabU36 та I-Mab425, та її відсутність у випадку використан-

ня кон'югату з МкАТ I-mMabE48. Інтерналізація відбувалась шляхом ендоцитозу після з'єднання фотоімунокон'югату з відповідним рецептором. В результаті руйнації ензимами лізосом утвореного молекулярного комплексу фотоімунокон'югату з рецепторами вивільнений фотосенсибілізатор розподілявся в зоні мітохондрій, а вже після опромінювання активований фотосенсибілізатор був здатний утворювати вільні радикали кисню, які і пошкоджували мембрану мітохондрій [2]. У результаті пошкодження мітохондріальних мембран у цитоплазму потрапляє цитохром С, який сприяє формуванню апоптосом з подальшою активацією проапоптозного каспазного каскаду. Таким чином, клітина комітується на апоптоз, що виявляється більш ефективним у загибелі пухлинної клітини, ніж пошкодження плазмалеми. Крім того, ці кон'югати виявилися токсичними для клітин A431, у той час як вільний Гп мав значно меншу фототоксичність. Відсутність інтерналізації кон'югованого Гп з МкАТ I-mMabE48 пояснюється відсутністю на поверхні клітин антигену, відповідного до МкАТ I-MabE48 [3]. Таким чином, застосування кон'югованого з МкАТ Гп значно збільшує ефективність ФДТ.

Слід відзначити, що на даний момент активно вивчається можливість застосування кон'югатів МкАТ з фотосенсибілізатором бензопорфірином (Бпф) [4]. Так в експериментах на моделі перещепленої сингенним мишам сквамозної карциноми людини (лінія A549), де використовувалися імунокон'югати на основі МкАТ 5E8 специфічних до антигену на клітинах A549, а також неспецифічних до цього антигену МкАТ T48 з міченим ізотопом вуглецю C14 Бпф, було показано чітку відмінність у накопиченні кон'югатів та вільного Бпф пухлинними тканинами. Вищий рівень накопичення сенсibilізатора, кон'югованого з МкАТ специфічними до антигену цієї пухлини, відзначали у тканині карциноми порівняно з вільним Бпф [5].

У цій же роботі в досліді на хом'яках з цією ж карциномою порівнювали ефективність ФДТ із застосуванням Бпф та фотофрину, похідного Гп. Тварини, які отримували вільний Бпф, демонстрували рівень накопичення фотосенсибілізатора в пухлині по відношенню до нормальної тканини в співвідношенні — 2 : 1, у той час як тварини, які отримували фотоімунокон'югат цього ж сенсibilізатора з МкАТ до рецептора EGFR, демонстрували значно більший рівень накопичення фотосенсибілізатора по відношенню до нормальної тканини, а саме — 26 : 1 ($p < 0,005$). При аналізі рівня виживаності тварин після ФДТ відзначали таку картину: при застосуванні фотофрину місячна виживаність складала 27%, вільного Бпф — 67% ($p = 0,03$), а Бпф, кон'югованого з МкАТ до рецептора EGFR — 80%. Отже, Бпф виявився більш ефективним, ніж фотофрин, а його селективність у накопиченні в пухлині може бути збільшена шляхом його кон'югації з МкАТ до рецептора EGFR [5].

Хлорин е-6 відноситься до фотосенсибілізаторів нового покоління. Порівняно з порфіринами хлоринові фотосенсибілізатори характеризуються рядом переваг: вони мають високі значення квантового виходу синглетного кисню (0,4–0,8), максимум їх поглинання знаходиться в діапазоні 650–800 нм, завдяки трьом кислотним залишкам в мають непогану розчинність у воді. Ось чому при застосуванні хлоринів можна досягти доволі значної глибини проникнення опромінення в пухлинну тканину — біологічні ефекти можуть здійснюватися на глибині 10–13 мм [6]. Застосування хлорину е-6, як і інших фотосенсибілізаторів хлоринового ряду (наприклад, бактеріохлорину) в якості фотосенсибілізатора при ФДТ пухлинних процесів є досить ефективним [7, 8]. Так, хлорин е-6 знайшов широке застосування фотодинамічній таргетній терапії в метастазах колоректального раку в печінці [9–11]. Відомо, що колоректальний рак метастазує в печінку з великою частотою.

Виникла проблема, пов'язана з високим накопиченням фотосенсибілізаторів не тільки в пухлинній тканині печінки. Більшість фотосенсибілізаторів, у тому числі і хлорини, виявляють доволі високий рівень акумуляції і в нормальній тканині печінки [12–15]. В зв'язку з цією обставиною стає актуальним використання цілеспрямованої ФДТ із застосуванням хлорину е-6, кон'югованого з МкАТ, специфічними до антигенів пухлинних клітин. Було показано, що використання хлорину е-6, кон'югованого з МкАТ Mab17.1A, які зв'язуються з антигенами колоректального раку ЕрСAM, дозволяє в деякій мірі вирішити проблему селективного накопичення фотосенсибілізатора саме у пухлинній тканині печінки і таким чином мінімізувати побічні ефекти та збільшити ефективність власне ФДТ [16]. До того ж при синтезі даного фотоімунокон'югату не відбувається погіршення фізико-хімічних властивостей хлорину е-6, зокрема його спектральних характеристик. У дослідях на щурах з перещепленими в печінку клітинами пухлини NT 29 (аденокарциноми людини) була виявлена значна ефективність імунокон'югату хлорин е-6 — антитіло 17.1A. Крім того, методом флюоресценції було показано, що даний фотоімунокон'югат має значно більшу селективність у накопиченні в пухлинній тканині порівняно із вихідним фотосенсибілізатором хлорином е-6. Більше того, застосування вільного вихідного фотосенсибілізатора призводить до системної токсичності та загибелі піддослідних тварин за рахунок масштабних уражень нормальних тканин. Однак при застосуванні фотоімунокон'югату ця системна токсичність виявляється мінімізованою. Поряд з цим визначалось суттєве скорочення ваги пухлини, середній показник виживання збільшився з 62,5 до 102 днів. Таким чином, в експериментах було показано ефективність використання цілеспрямованої ФДТ завдяки використанню хлорину е-6, кон'югованого з МкАТ [9, 10]. Крім того, кон'югати хлорину з МкАТ крім терапевтичних цілей можна використовувати і в діагностиці злоякісних пухлин та передпухлинних хвороб з метою окреслення контурів пухлин для подаль-

шого хірургічного втручання або проведення оцінки ефективності застосування лікувальних заходів.

Останнім часом при створенні фотосенсибілізуючих кон'югованих сполук увагу дослідників привертають фталоціанінові сполуки. Для фталоціанінів притаманний максимум поглинання в межах 670–700 нм. Це дозволяє після опромінювання ініціювати біологічні ефекти в тканині на глибині 10 мм [17]. Взагалі фталоціаніни є гідрофобними сполуками. Крім того, введення в молекулу цих фотосенсибілізаторів сульфогруп призводить до набуття фотосенсибілізаторами властивостей гідрофільної сполуки з покращенням їх розчинності, а відтак і полегшення доставки до пухлини [18]. Найбільш вивченими являються саме сульфуровані фталоціаніни, які можуть відрізнятися центральним атомом металу та кількістю сульфогруп. Відомо, що при збільшенні кількості сульфогруп збільшується і розчинність цих фотосенсибілізаторів [19]. Тетрасульфонат алюміній(III)-фталоціанін, саме і являється таким модифікованим гідрофільним фотосенсибілізатором. Але на відміну від гідрофобних фотосенсибілізаторів цієї групи, гідрофільний тетрасульфонат алюміній(III)-фталоціанін не здатний проникати через мембрану клітин, а відтак не досягає внутрішньоклітинних структур, що значно зменшує ефективність ФДТ [19]. У зв'язку з цим виникає доцільність кон'югування цього фотосенсибілізатора з МкАТ, які можуть покращити інтерналізацію його до клітини. В досліді на клітинах сквамозної карциноми А431 із застосуванням тетрасульфонату алюміній(III)-фталоціаніну, кон'югованого через тетрагліциновий мостик з химерними МкАТ сМабU36 та МкАТ mMabE48 та mMabE425, відзначали збереження кон'югованими антитілами притаманних їм властивостей та стабільність у сироватці крові. Розчинність цих сполук, як виявилось, порівняно з вихідним сенсибілізатором дещо погіршилася. Було показано, що найбільшу фототоксичність до клітин проявляє тетрасульфонат алюміній(III)-фталоціанін, кон'югований з МкАТ mMabE425. З'ясували, що він у 7500 разів токсичніший порівняно з вихідним фотосенсибілізатором. Кон'югати з химерними МкАТ сМабU36 та МкАТ mMabE48, на відміну від кон'югатів з mMabE425, засвоювалися пухлинними клітинами гірше через відсутність специфічних для них антигенів [20].

Кон'югати фотосенсибілізаторів з іншими біологічно активними речовинами. Відомо, що білки сироватки крові відіграють велику роль у транспортуванні різноманітних речовин, у тому числі і фармацевтичних препаратів. Білки сироватки крові (власне альбумін та ліпопротеїди) також відіграють надзвичайно велику роль у транспортуванні молекул фотосенсибілізатора [21].

Альбумін володіє унікальною властивістю зворотно зв'язуватися з великою кількістю ендogenous або екзогенних лігандів. Здатність зв'язуватися з таким широким спектром лігандів пояснюється тим,

що цей білок має доволі гнучку просторову структуру, яка зазнає перебудов у залежності від структури ліганда, з яким він зв'язується [22]. Саме ці властивості альбуміну спонукали дослідників до використання його в цілеспрямованій ФДТ. Цінність застосування альбуміну в цілеспрямованій ФДТ пояснюється ще й тим, що цей білок являється важливим джерелом амінокислот для пухлинних клітин. Власне завдяки високій інтенсивності метаболізму альбуміну в пухлині і відбувається своєрідне накопичення його в екстрацелюлярному матриксі пухлинної тканини. Наприклад, в експериментах на мишах з перещепленою пухлиною — карциномою людини Т380 використовували кон'югат альбуміну з фталоціаніном. Показано, що регресія пухлин відзначалася вже при дозах препарату 0,5 та 0,2 мМ/кг при проведенні ФДТ через 24 год після введення кон'югату [21]. До речі слід сказати, що кон'югат отримували з альбуміну бичачої сироватки.

В іншому експерименті досліджували альбумін, кон'югований з хлорином е-6 [23–25]. У досліді *in vitro* на макрофагоподібних клітинах лінії J774 та раку яєчника людини методом флюоресценції виявили, що кон'югат краще накопичується макрофагоподібними клітинами J774 порівняно з клітинами лінії OVCAR-5. Пояснюється це тим, що у макрофагоподібних клітин краще виражені скавенджер-рецептори. Відповідно і ефективність фотодинамічної дії була кращою на цих клітинах [21]. Ймовірно, після сполучення кон'югату з скавенджер-рецепторами, він шляхом ендцитозу потрапляє до клітини, перш за все до лізосом, де під дією ензимів вивільнюється хлорин е-6. Далі цей фотосенсибілізатор може перерозподілятися по клітині, потрапляючи до так званих критичних субклітинних структур, наприклад мітохондрій. У випадку пошкодження мембрани мітохондрій клітина швидко комітується на шлях апоптозу, іншими словами, запускається проапоптозний каспазний каскад. Таким чином, чим більше виражені на поверхні клітини скавенджер-рецептори, тим краще сполучається кон'югат з клітиною, а найголовніше, він краще інтерналізується в клітину шляхом ендцитозу. Як результат, підвищується ефективність терапії із застосуванням кон'югату фотосенсибілізатор-альбумін бичачої сироватки.

Деякі автори стверджують, що для ефективності цілеспрямованої ФДТ недостатньо тільки селективності в накопиченні фотосенсибілізаторів тканинами пухлин. Виявляється, що для підвищення ефективності ФДТ необхідно не тільки забезпечити досилку фотосенсибілізатора до цитоплазми клітини, а й забезпечити його розподіл по критичним зонам клітини [25].

Так, на клітинах гепатоми людини лінії PLC/PRF/5 продемонстрували збільшення фоточутливості клітин у результаті застосування кон'югованого інсуліну з хлорином е-6. Дія цього кон'югату спрямовувалася, перш за все, на рецептор інсуліну EC50. У досліді порівнювали ефективність застосування вільного хлорину е-6

та кон'югованого з інсуліном [26]. Кон'югат виявився більш ефективним, ніж вільний хлорин е-6. Крім того, актуальним є вивчення доставки фотосенсибілізаторів до ядра пухлинної клітини. На даний момент проводяться спроби для здійснення інтерналізації фотосенсибілізатора в клітину з подальшою його локалізацією в ядрі. Так був отриманий кон'югат на основі бичачого альбуміну (для збільшення аплікації молекул фотосенсибілізатора на молекулі ліганду, здатного до інтерналізації через клітинну мембрану), інсуліну (інтерналізуючий ліганд) з фотосенсибілізатором хлорином е-6. Встановлено, що інтерналізація цього кон'югату відбувається шляхом ендоцитозу [27]. Локалізацію фотосенсибілізатора в клітині та спроможність його продукувати синглетний кисень встановлювали за допомогою 2',7'-дихлорфлюорисцин діацетату, який здатний перетворюватися на флюоресцентну похідну 2',7'-дихлорфлюорисцина при реакції з активними різновидами кисню. Після 4 год інкубації з кон'югатом альбумін-інсулін-хлорин е-6 з подальшим опромінюванням відзначали збільшення флюоресценції якраз у зоні клітинного ядра, що вказує на продукцію активного кисню. Також виявили, що фотодинамічний ефект відзначали як при низьких концентраціях рецептора EC50s, що було достатнім для вивільнення хлорину е-6, так і при низьких дозах опромінювання [26].

Відомо, що переважає більшість пухлинних клітин продукує на своїй поверхні рецептор епідермального фактора росту (EGFR) у значно вищій концентрації порівняно з нормальними клітинами. EGFR контролює багато клітинних функцій: клітинний поділ, диференціацію, виживання клітин, їх рухливість. Усі ці функції реалізуються через відповідні шляхи сигнального каскаду. Зазначають, що фактично >30% клітин раку яєчника мають підвищений рівень експресії EGFR [28–32]. У багатьох випадках підвищений рівень концентрації EGFR корелює з несприятливим прогнозом. Тобто підвищений рівень експресії EGFR являється своєрідним маркером пухлини, який можна використовувати у цілеспрямованій терапії. Епідермальний фактор росту (EGF) являється лігандом до цього рецептора, а відтак він може транспортувати фотосенсибілізатор в зону підвищеної концентрації рецептора, тобто безпосередньо до тканини пухлини. Таким чином, виникає доцільність у створенні кон'югатів на основі цитокіну EGF та фотосенсибілізатора. EGF — невеликий поліпептид масою 6 кДа. EGF, зв'язавшись з рецептором EGFR на поверхні клітини, активує кіназний каскад сигнальної трансдукції, відповідальний за проліферативну активність епідермальних та епітеліальних клітин. Після сполучення з EGF рецептор виявляє тирозинкіназну активність. Крім того, EGF виконує важливу функцію у неоангіогенезі [33].

В експериментах порівнювали цитостатичну ефективність вільних фотосенсибілізаторів дисульфонату алюміній-фталоціаніну та дисульфонату кобальт-

фталоціаніну та їх кон'югатів з EGF. На клітинах карциноми молочної залози лінії MCF-7 було показано, що кон'югат дисульфонату алюміній-фталоціаніну проявляв значно більшу цитостатичну активність, ніж вільний алюміній-фталоціанін. Кон'югат на основі дисульфонату фталоціаніну кобальту виявився в 100 разів ефективніший по цитотоксичній дії, ніж сам вільний фотосенсибілізатор. Слід відзначити, що і в дослідах *in vivo* на моделі з меланою В16, де використовували кон'юговані фотосенсибілізатори, виявили більш ефективну дію кон'югатів у пригніченні росту пухлини порівняно з вільними фотосенсибілізаторами [34].

Проводили експерименти з використанням більш складного за структурою кон'югату, що був синтезований на основі хлорину, а саме комплексу хлорин е-6-олово, який в свою чергу з'єднувався з EGF через декстрин, полівініловий спирт або альбумін [35, 36]. Виявили, що хлорин е-6-олово, кон'югований з EGF через декстран, зв'язувався в 100 разів більш споріднено з рецептором, ніж його природний ліганд — некон'югований EGF. Кон'югат на основі проміжного зв'язку через альбумін теж мав високу спорідненість до рецептора, однак гірше конкурував з вільним EGF. У той же час кон'югат на основі проміжного зв'язку через полівініловий спирт не зв'язувався з рецептором взагалі. Також вивчали фототоксичність цих кон'югатів на клітинних лініях MDA-MB-468 та A431. Ці лінії клітин характеризуються високим рівнем експресії EGFR. Значний рівень фототоксичності при дозі опромінювання 27 кДж/м² виявився при застосуванні сенсибілізатора, кон'югованого з EGF через альбуміновий місток [36]. Незважаючи на відсутність спорідненості до рецептора, найвищий рівень фототоксичності продемонстрував кон'югат із містком з полівінілового спирту. Однак він виявився значно токсичнішим порівняно з кон'югатом із застосуванням декстрану. Проте фототоксичність кон'югату з декстраном дорівнювала фототоксичності простого кон'югату хлорин е-6-EGF. Можливо, в даному випадку більше значення мають транспортні властивості полівінілового спирту, ніж здатність ліганду зв'язуватися з рецептором. Пояснюючи менший рівень фототоксичності кон'югату з альбуміном порівняно з кон'югатом із полівініловим спиртом, припускають, що в даному випадку відіграє вирішальну роль саме ступінь спорідненості цього кон'югату. Фототоксичність була б значно кращою, якщо б цей кон'югат краще конкурував з вільним EGF за рецептори [35, 36].

Цілеспрямована антиангіогенна фотодинамічна терапія. Ангіогенез — процес, який є вкрай необхідним для пухлинного росту [37–39], може слугувати надзвичайно важливою мішенню для ФДТ пухлин. При використанні такого варіанту ФДТ, де її дія буде спрямована на блокаду тих чи інших ланок неангіогенезу, застосовують, як правило, МкАТ до рецепторів фактора росту ендотеліоцитів або безпосередньо до самого ліганду цих рецепторів — фактора VEGF. При цьому з МкАТ хімічно зв'язується

фотосенсибілізатор, який власне і викликає фотохімічну реакцію [40].

Слід сказати, що робіт, проведених у галузі цілеспрямованої ФДТ, скерованої безпосередньо на блокаду процесів ангиогенезу пухлин, небагато, хоча стратегія боротьби зі злякисними пухлинами, яка базується на антиангіогенній терапії, має доволі широку історію. Це порівняно новий альтернативний напрямок антиангіогенної терапії пухлин. На відміну від онкології, цей метод лікування в офтальмологічній практиці застосовується протягом порівняно тривалого проміжку часу. Слід зауважити, що шляхи цілеспрямованої антиангіогенної ФДТ споріднені як при лікуванні офтальмологічних захворювань, асоційованих з патологічним неоваскуляризацією злякисних пухлин. Взагалі вирізняють два напрямки блокування процесів ангиогенезу при цілеспрямованій ФДТ. В одному випадку дія імунокон'югатів скеровується на ліганди, які здатні стимулювати ангиогенез (фактори ангиогенезу), в другому — на рецептори ендотеліоцитів, які відповідальні за активацію кіназного каскаду, що обумовлює їх проліферацію. При скеровуванні дії імунокон'югату на ліганд досягається накопичення кон'югованих антитіл в екстрацелюлярному матриксі і фотодинамічна дія буде спрямована перш за все на плазмалемні ендотеліоцитів. У цьому випадку ефективність антиангіогенної ФДТ буде дещо знижена. При дії фотоімунокон'югату на рецептори ендотеліоцитів з'являється можливість інтерналізації фотосенсибілізатора всередину клітини. В цьому випадку ендотеліальна клітина з більшою вірогідністю буде підлягати апоптозу, а відтак ефективність терапії буде вищою. Треба зазначити, що в якості носіїв фотосенсибілізатора для цілеспрямованої антиангіогенної ФДТ найчастіше використовують антитіла та ліпосоми.

На даний момент отримано ряд МкАТ, специфічних до фактора VEGF або до його рецепторів. Деякі з них у вигляді кон'югатів з фотосенсибілізаторами добре зарекомендували себе в тій же офтальмології [42]. Є відомості щодо застосування ліпосом, кон'югованих з фотосенсибілізатором, в цілеспрямованій антиангіогенній ФДТ [42, 43]. Було виявлено, що після введення подібних препаратів через 15 хв вони спроможні пошкоджувати ендотелій. Досліджено, що ліпосоми, навантажені Бпф, доносяться до тканини пухлини пасивно. Слід сказати, що ліпосоми застосовуються для транспортування гідрофобних фотосенсибілізаторів, наприклад Бпф. При використанні цих структур, вірогідно, має значення фактор тропності фотосенсибілізатора до пухлини, чим можна пояснити селективне його накопичення в пухлині при транспортуванні ліпосомами. Однак є джерела, які стверджують, що подібні ліпосоми мають мінімальний клінічний ефект при застосуванні у ФДТ, хоча вони значно підвищують рівень накопичення фотосенсибілізатора в тканині пухлини вже через 3 год. Пояснюють це тим, що

після лазерного опромінювання синглетний кисень, продукований фотосенсибілізатором, не пошкоджував клітини, оскільки життя активного кисню не тривале. Радикалу кисню просто не вистачає часу для проходження відстані між внутрішньою частиною ліпосоми та клітиною. При цьому кон'югати ліпосом та фотосенсибілізаторів концентруються в екстрацелюлярному матриксі. При розгляданні цього досліду можна якраз пересвідчитися в тому, що при накопиченні препарату в екстрацелюлярному матриксі (внаслідок зв'язування з лігандом, або застосування ліпосом) ефективність терапії погіршується, що власне і зазначалося вище. Взагалі локалізація фотосенсибілізатора є важливим ключем, який і визначає ефективність ФДТ.

Крім того, виникає необхідність більш точної досилки фотосенсибілізатора безпосередньо до пухлинної клітини чи до ендотеліоциту. Так, для орієнтації цих кон'югатів на ендотеліоцити використовують пентамерний пептид Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG). Ліпосоми, кон'юговані із вказаним пептидом, можна вибірково застосовувати саме в антиангіогенній терапії. Шляхом гістохімічного аналізу виявили, що накопичення таких кон'югатів у пухлині не відбувалося, натомість він виражено накопичувався в ендотелію [42]. Слід відзначити, що подібні ліпосомальні кон'югати для ФДТ можуть бути модифіковані з метою збільшення їх селективності. Модифікують їх також з метою збільшення рівня накопичення або в тканині пухлини, або в ендотелію. Більше того, виявили, що модифіковані ліпосомальні фотокон'югати мають більшу селективність порівняно з вільним фотосенсибілізатором [42, 43].

Досліди на мишах з перещепленою карциномою лінії Colon 26 NL-17 та саркомою Meth-A показали, що ліпосоми, кон'юговані за схемою ліпосома-бензопорфірин-APRPG-поліетіленгліколь, мають значно кращу селективність у накопиченні порівняно з ліпосомальним кон'югатом APRPG-поліетіленгліколь-ліпосома-бензопорфірин та кон'югатом поліетіленгліколь-ліпосома-бензопорфірин, який власне не здатен орієнтуватися до клітин. Саме тому в цьому досліді відзначали гальмування росту пухлини, вважаючи, що ФДТ спрямовувалася в цьому випадку саме на ушкодження ендотеліальних клітин і виявилася більш ефективною, ніж цілеспрямована ФДТ на пухлинні клітини. Опромінювання проводили через 3 год, оскільки вважали, що за цей час кон'югати краще зв'яжуться з ендотеліоцитами, хоча деякі автори вказують на те, що кон'югат розподіляється по ендотелію вже через 15 хв [42]. Крім того, з'ясували, що через 3 год після ФДТ утворювалася закупорка судин, порушення в системі гемостазу [42, 43].

Суттєві результати одержані при блокуванні патологічного ангиогенезу в сітківці ока кон'югованим через полівініловий спирт та пептид ATWLPPR вертепорфіном — похідним Бпф. Цей кон'югат проде-

монстрував високу ступінь спорідненості до VEGFR2 — рецептора фактора росту судинного ендотелію (VEGF). Співвідношення в кон'югаті вертепорфірину та пептиду складало 28 : 1, при цьому зберігалися всі фізико-хімічні властивості сенсibilізатора. На гістологічних зрізах сітківки після ФДТ уже через годину виявили некротичні процеси в ендотелію [44]. Результати, отримані в офтальмології, засвідчують непоганий ефект в пошкодженні васкулярної системи, що дає привід для застосування подібного кон'югату при лікуванні злоякісних пухлин.

Так в досліді на моделі ангиогенезу ока кроля, де використовували кон'югований з індоціаніном фрагмент McATscFvL19, специфічних до фібронектину — одного з чільних маркерів судинної сітки, також відзначали блокаду процесів неоангиогенезу. Але, на жаль, цей кон'югат виявив суттєві недоліки, пов'язані з низьким рівнем продукції синглетного кисню фотосенсibilізатором індоціаніном [45].

Якщо говорити про дослідження імунокон'югатів, орієнтованих на ліганд — VEGF, то треба відзначити, що їх зовсім немає. Останнім часом з'явився лише один препарат на основі кон'югованого того ж вертепорфіну з візудіном — антитілами до фактора VEGF [46]. Відомо, що при застосуванні цих нативних антитіл відзначали значну затримку росту пухлин, а в деяких випадках ріст взагалі припинявся. Так, при дослідженні препарату кон'югованого з візудіном (антитілами до фактора VEGF) вертепорфіну з'ясували, що спектр емісії кон'югованого фотосенсibilізатора не відрізнявся від спектра емісії вільного вертепорфіна. Також досліді проводили на культурі ендотеліоцитів. Культуру ендотеліоцитів опромінювали лазером, після чого визначали виживаність клітин через 1 та 24 год. З'ясували, що через годину після опромінювання виживаність ендотеліоцитів знижувалася до 6%, ($p < 0,0001$), через 24 год — до 4% ($p < 0,0001$). При відсутності опромінювання виживаність складала 40%. При визначенні цитотоксичності з'ясували, що кон'югований вертепорфін більш токсичний, ніж вільний, хоча між ними не було статистично достовірної різниці. Таким чином, кон'югований з візудіном вертепорфін потенційно може бути доволі ефективним препаратом у фотодинамічній цілеспрямованій антиангіогенній терапії.

Можна припустити, що ефективність кон'югованих з антитілами препаратів, скерованих на блокування активності VEGF (на зразок візудіна) може бути пояснена не тільки фотодинамічною дією, але й нейтралізацією дії пулу VEGF в екстрацелюлярному матриксі, внаслідок чого фактор не може потрапляти до рецепторів VEGFR, а відтак не може стимулюватися проліферативний сигнал ендотеліоцитів. Це певною мірою може компенсувати неспроможність інтерналізації фотосенсibilізатора до клітини, де фотодинамічна дія була би значно ефективнішою. Крім того, при орієнтуванні фотоімунокон'югату на рецептори VEGFR можна досягти подібного

синергічного ефекту, оскільки внаслідок зв'язування фотоімунокон'югату з рецептором може блокуватися функція цього рецептора, в результаті чого відбувається гальмування клітинного поділу ендотеліоцитів.

Отже, цілеспрямована антиангіогенна ФДТ — порівняно молодий напрямок в онкології. Завдяки їй досягається високоефективна селективність у накопиченні фотосенсibilізатора саме у васкулярній мережі пухлин, за рахунок чого мінімізуються побічні ефекти та підвищується ефективність терапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Mew D, Wat CK, Towers GH, Levy JC. Photoimmunotherapy treatment of animal tumors with tumor — specific monoclonal antibody — hematoporphyrin conjugates. *J Immunol* 1983; **130**: 1473–7.
2. Engbrecht BW, Menon C, Kachur AV, Fraker DL. Photofrin — mediated photodynamic therapy induces vascular occlusion and apoptosis in a human sarcoma xenograft model. *Cancer Res* 1999; **59** (17): 4334–42.
3. Vronraets MB, Visser GV, Loup C, *et al.* Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy. *Int J Cancer* 2000; **88** (1): 108–14.
4. Jiang FN, Richter AM, Jain AK, *et al.* Biodistribution of a benzoporphyrin derivative monoclonal antibody conjugate in A549 — tumor bearing nude mice. *Biotechnol Ther* 1993; **4** (1–2): 43–61.
5. Hemming AW, Davis NL, Dubois B, *et al.* Photodynamic therapy of squamous cell carcinoma. An evaluation of a new photosensitizing agent benzoporphyrin derivative and new photoimmunoc conjugate. *Surgical Oncol* 1993; **2** (Issue 3): 187–96.
6. Миронов АФ. Фотодинамическая терапия рака — новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных заболеваний. *Соросовский образовательный журн* 1996; **8**: 32–40.
7. Van Hillegersberg R, Pickering JW, Aalders M, Beek JF. Optical properties of rat liver and tumor at 633 nm and 1064 nm: photofrin enhances scattering. *Lasers Surg Med* 1993; **13** (1): 31–9.
8. Rovers JP, Schuitmaker JJ, Vahrmeijer AL, *et al.* Interstitial photodynamic therapy with the second-generation photosensitizer bacteriochlorin a in a rat model for liver metastases. *Br J Cancer* 1998; **77** (12): 2098–103.
9. Hamblin MR, Del Governatore M, Rizvi I, Hasan T. Biodistribution of charged 17.1A photoimmunoc conjugates in a murine model of hepatic metastasis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; **83** (11): 1544–51.
10. Del Governatore M, Hamblin MR, Christopher R Shea, *et al.* Experimental photoimmunotherapy of hepatic metastases of colorectal cancer with a 17.1A chlorin e6 immunoc conjugate. *Cancer Res* 2000; **60**: 4200–5.
11. Van Hillegersberg R, Marijnissen JP, Kort WJ, *et al.* Interstitial photodynamic therapy in a rat liver metastasis model. *Br J Cancer* 1992; **66** (6): 1005–14.
12. Woodburn KW, Stylli S, Hill JS, *et al.* Evaluation of tumour and tissue distribution of porphyrins for use in photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1992; **65** (3): 321–8.
13. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1996; **64** (3): 469–85.
14. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, *et al.* Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90** (12): 889–905.
15. Van Hillegersberg R, Van den Berg JW, Kort WJ, *et al.* Selective accumulation of endogenously produced porphyrins

in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterol* 1992; **103** (12): 647–51.

16. **Governatore MD, Hamblin MR, Shea CR, et al.** Experimental Photoimmunotherapy of Hepatic Metastases of Colorectal Cancer with a 17.1A Chlorin e-6 Immunoconjugate. *Cancer Research* 2002; **60** (8): 4200–5.

17. **Rosenthal I.** Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1991; **53** (6): 859–70.

18. **Миронов АФ.** Фотосенсибилизаторы на основе порфиринов и родственных соединений для фотодинамической терапии. *Итоги науки и техники* 1990; (3): 5–63.

19. **Peng Q, Moan J.** Correlation of distribution of sulfonated aluminium with their photodynamic effect in tumor and skin of mice bearing CaD2 mammary carcinoma. *Br J Cancer* 1995; **72** (3): 565–74.

20. **Vrounraets MB, Visser GV, Stigter M, et al.** Targeting of aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies: improved efficacy in photodynamic therapy. *Cancer Res* 2001; **61** (5): 1970–5.

21. **Wesley M, Sharman WM, Johan E, et al.** Aller. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; **56** (Issue 1): 53–76.

22. **Gantchev TG, Ouellet R, van Lier JE.** Binding interactions and conformational changes induced by sulfonated aluminum phthalocyanines in human serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 1999; **366** (1): 21–30.

23. **Hamblin MR, Miller JL, Ortel B.** Scavenger-receptor targeted photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2000; **72** (4): 533–40.

24. **Hamblin MR, Huzaira M, O'Donnell DA.** Scavenger receptor-targeted photodynamic therapy of murine tumors in vivo. 13th International Congress on Photobiology, San Francisco. CA 2000; (Abstract): 173.

25. **Rosenkranz AA, Jans DA, Sobolev AS.** Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol Cell Biol* 2000; **78** (4): 452–64.

26. **Norbyrby CJ, Zhivotovsky B.** DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 2004; **23** (16): 2797–808.

27. **Akhlynina TV, Rosenkranz AA, Jans DA, et al.** The use of internalizable derivative of chlorin e6 for increasing its photosensitizing activity. *Photochem Photobiol* 1993; **58** (1): 45–8.

28. **Hemming AW, Davis NL, Dubois B, et al.** Photodynamic therapy of squamous cell carcinoma. An evaluation of a new photosensitizing agent benzoporphyrin derivative and new photoimmunoconjugate. *Surgical Oncol* 1993; **2** (Issue 3): 187–96.

29. **Gullick WJ.** Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *Br Med Bull* 1991; **47** (1): 87–98.

30. **Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al.** Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995; **1** (11): 1311–8.

31. **Divgi CR, Welt S, Kris M, et al.** Phase I and imaging trial of indium 111 — labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83** (2): 97–104.

32. **Schwartz GK.** Invasion and metastases in gastric cancer: in vitro and in vivo models with clinical correlations. *Semin Oncol* 1996; **23** (3): 316–24.

33. **Harris RC, Chung E, Coffey RJ.** EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2003; **284**: 2–13.

34. **Lutsenko SV, Feldman NB, Finakova GV, et al.** Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates. *Tumour Biol* 1999; **20** (4): 218–24.

35. **Gijsens A, Witte de P.** Photocytotoxic action of EGF-PVA-Sn(IV)chlorin e6 and EGF-dextran-Sn(IV)chlorin e6

internalizable conjugates on A431 cells. *Int J Oncol* 1998; **13** (6): 1171–7.

36. **Gijsens A, Missiaen L, Merleved W, Witte de P.** Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorin e6 selectively potentiates its photodynamic therapy. *Cancer Res* 2000; **60** (8): 2197–202.

37. **Dudek AZ, Pawlak WZ, Kirstein MN.** Molecular targets in the inhibition of angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* 2003; **7** (4): 527–41.

38. **Ровенский ЮА.** Клеточные и молекулярные механизмы опухолевой инвазии. *Биохимия* 1998; **63** (9): 1204–21.

39. Молекулярно-генетичні детермінанти раку молочної залози: теоретичні засади практичного застосування в діагностиці і лікуванні. *Здоров'я жінки* 2005; **41** (24): 189–98.

40. **Shimizu K, Oku N.** Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol Pharm Bull* 2004; **27** (5): 599–605.

41. **Ursula M, Erfurth S, Pruenste C.** Management of neovascular age-related macular degeneration. *Progress Rational Eye Res* 2007; **24** (Issue 4): 437–51.

42. **Kanae Ichikawa, Tomoya Hikita, Noriyuki Maeda, et al.** PEGylation of liposome decreases the susceptibility of liposomal drug in cancer photodynamic therapy. *Biol Pharm Bull* 2004; **27**: 443–4.

43. **Takeuchi Y, Kurohade K, Ichicawa K, et al.** Induction of intensive tumor suppressor by antiangiogenic photodynamic therapy using polycation-modified liposomal photosensitizer. *Cancer* 2003; **97**: 2027–34.

44. **Renno RZ, Terada Y, Haddadin MJ, et al.** Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arch Ophthalmol* 2004; **122** (7): 1002–11.

45. **Birchler M, Viti F, Zardi L, et al.** Selective targeting and photocoagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment. *Nat Biotech* 1999; **17**: 984–8.

46. **Mayo GL, Melendez RF, Kumar N, et al.** Antibody-targeted photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 2003; **36** (6): 1151–2.

PHOTOACTIVE CONJUGATES FOR TARGETED ANTI-TUMOR PHOTODYNAMIC THERAPY

A.A. Mamchur, I.O. Lisnyak, N.L. Novichenko

Summary. Evidence concerning application of photodynamic targeted therapy and potential of its application for the suppression of tumor growth and development are analyzed. Also emphasis is given to the usage of photoimmunoconjugates with different possible carries — biologically active substances: cytokines, liposomes, albumin, hormones.

Key Words: photoimmunoconjugates, photodynamic targeted therapy, vascular endothelial growth factor, photosensitizer, apoptosis.

Адреса для листування:

Мамчур А.А.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України