

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи

ПАШКИНА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА
Иммуномодулирующие свойства комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом

14.03.09 – «клиническая иммунология и аллергология»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель
академик РАН, д.м.н., проф. Козлов В.А.

Новосибирск-2015

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОК – антителообразующие клетки
СВ[n] – кукурбит[n]урил
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
МНК – моноклеарные клетки
ПК – периферическая кровь
НСТ – нитрасиний тетразолий
ЭБ – эритроциты барана
ИЛ – интерлейкин
ФНО α – фактор некроза опухоли альфа
КонаА – конканавалин А
FCS – эмбриональная телячья сыворотка
ИНФ γ – интерферон гамма
 λ – длина волны
U - уровень напряжения
ПЭГ - полиэтиленгликоль
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
FSC – параметр прямого светорассеяния
SSC – параметр бокового светорассеяния
7-AAD – 7 актиномицин D
Th – т-хелперы

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Биологически активные пептиды.....	12
1.1.1. История исследования, применение, свойства пептидных препаратов.....	12
1.1.2. Лекарственные средства на основе пептидов, применяемые в иммунологии.....	17
1.1.3. Негативные факторы, возникающие при применении белковых либо пептидных препаратов.....	23
1.1.4. Защита от биодegradации путем применения альтернативных методов введения пептидных препаратов.....	24
1.1.5. Стабилизация пептидных препаратов путем использования различных систем доставки лекарственных средств.....	24
1.2. Кукурбитурил как комплексообразующее вещество.....	37
1.2.1. Общая характеристика и свойства кукурбитурилов.....	37
1.2.2. Комплексы кукурбитурилов по типу «гость-хозяин» с различными лекарственными средствами.....	40
1.2.3. Возможность образования комплексов «гость-хозяин» СВ[n] с различными лекарствами на основе пептидов.....	42
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1. Используемые реактивы.....	45
2.2. Конкурентное флуоресцентное титрование.....	45
2.3. Выделение МНК ПК из периферической крови человека.....	48
2.4. Культивирование МНК ПК in vitro.....	48
2.5. Оценка пролиферативной активности клеток.....	49
2.6. Оценка показателей клеточного цикла.....	49
2.7. Определение количественного содержания цитокинов иммуноферментным методом.....	50
2.8. Характеристика и условия содержания лабораторных животных.....	50

2.9. Получение перитонеальных макрофагов и нейтрофилов.....	51
2.10. Оценка продукции супероксидного радикала перитонеальными нейтрофилами и макрофагами мыши.....	53
2.11. Оценка Fc-рецептор опосредованного фагоцитоза.....	53
2.12. Оценка показателей иммунной системы <i>in vivo</i> (АОК, ГЗТ).....	55
2.13. Статистическая обработка полученных данных.....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	57
3.1. Исследование комплексообразования СВ[7] с тафтсином.....	57
3.2. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на пролиферацию МНК ПК.....	61
3.3. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на цитокинпродуцирующую способность МНК ПК.....	64
3.4. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на продукцию супероксидного радикала <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	68
3.5. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7]ом на показатели клеточности перитонеального экссудата мышей при перитонеальном введении.....	70
3.6. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов.....	72
3.7. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на реакции гуморального и клеточного иммунитета <i>in vivo</i>	75
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
ВЫВОДЫ.....	93
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	95

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

На сегодняшний день известно большое количество пептидов, обладающих иммуномодулирующим действием (Ярилин А.А. 2004; под ред. Смирнова, 2003; Edvards *et al.*, 1999). Иммуномодулирующие пептиды используются для коррекции нарушений при вторичных иммунодефицитах, а также как сопутствующее лечение инфекционных и онкологических заболеваний. Для пептидных препаратов наиболее распространенным методом использования остается инъекционное введение. Необходимость инъекирования делает проблематичным амбулаторное лечение пациента, затрудняет применение препарата у детей младшего возраста, а в некоторых случаях запрещает применение лекарства, например, у пациентов с сахарным диабетом из-за большого числа осложнений. Наряду с этим, были сделаны попытки перорального, буккального, интраназального, легочного, глазного и ректального введения (Sayani and Chien, 1996; Lee *et al.*, 1999; Torres and Peppas, 2000). Наиболее удобным в применении является пероральный способ приема, который, вместе с тем, имеет существенные недостатки, в частности, при пероральном введении белковые и пептидные молекулы подвергаются биодegradации в ЖКТ. Чтобы избежать этого, разработаны различные способы защиты белковых препаратов, включая химическую модификацию аминокислот, повышение их гидрофобности, использование ферментных ингибиторов, применение усилителей абсорбции, использование различных переносчиков, таких как микросферы, наночастицы, липосомы (Sela *et al.*, 1997; Goyal *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2007; Shaji and Patole, 2008; Pandey *et al.*, 2009). Все эти способы защиты не дают стопроцентно эффективного результата, поэтому поиск новых методов защиты пептидов от биодegradации остается насущной проблемой.

В качестве одного из таких методов и может быть предложено комплексообразование целевых молекул по типу гость-хозяин с биоинертными молекулами, способными помещать в себя пептиды посредством нехимического взаимодействия. К подобным молекулам-хозяевам относятся кукурбит[7]урилы (Hennig *et al.*, 2007). Комплекс между кукурбитурилами и пептидами образуется за счет связывания боковых радикалов аминокислотных остатков полипептидной цепи положительно заряженных аминокислот (аргинин, лизин), а также гидрофобных аминокислот, содержащих ароматическое кольцо (фенилаланин, тирозин, триптофан) (Buschmann *et al.*, 2005; Cong *et al.*, 2006; Zhang, 2006; Hennig *et al.*, 2007; Rajgariah and Urbach, 2008). Образование комплексов кукурбитурилов с пептидами не обеспечивает полную защиту для крупных пептидов, поэтому целесообразно использовать небольшие пептиды, имеющие всего несколько остатков аминокислот. Механизм образования и условия поддержания устойчивых комплексов пептидов с кукурбит[n]урилами по типу гость-хозяин необходимо изучать и подбирать в каждом индивидуальном случае. Селективность связывания кукурбитурилов с аминокислотами обусловлена электростатическим зарядом. Показано, что для тирозина наблюдается более тесное связывание с кукурбит[8]урилом по сравнению с фенилаланином, так как ароматическое кольцо в молекуле тирозина более богато электронами, нежели ароматическое кольцо фенилаланина. Аффинность между кукурбитурилом и аминокислотным остатком зависит от положения аминокислоты в пептиде (Bush *et al.*, 2005). Это связано с перераспределением заряда в молекуле в водном растворителе. В работе Hennig *et al.* (2007) показано, что образование комплексов пептидов с кукурбитурилами препятствует гидролизу субстратов лейцинаминопептидазой, трипсином и другими ферментами, распознающим положительно заряженные аминокислотные остатки. В связи с этим представляет интерес исследование иммуномодулирующих пептидов,

способных образовывать комплексы с кукурбитурилами. К одному из таких пептидов относится стимулятор фагоцитоза тафтсин (Перельмутер и др., 2004; Клодт и др., 2005; Babcock *et al.*, 1983; Khan *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007). В настоящее время данный пептид применяется в клинике в инъекционной форме (Павлов, Самонина, 2004). Тафтсин состоит из четырех аминокислотных остатков (Thr-Lys-Pro-Arg), комплексообразование с которым может происходить за счет связывания с положительно заряженными остатками аргинина и лизина.

Цель работы.

Изучить свойства комплекса кукурбит[7]урида с иммуномодулирующим пептидом тафтсином в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*.

В соответствии с целью были сформулированы следующие задачи:

1. Получить соединение включения по типу «гость-хозяин» кукурбитурида с тафтсином, исследовать его свойства. и подобрать оптимальные условия для комплексообразования.
2. Исследовать влияние кукурбит[7]урида на иммуннокомпетентные клетки.
3. Исследовать иммуномодулирующие свойства комплекса кукурбит[7]урида с тафтсином *in vitro*: влияние комплекса на фагоцитоз и продукцию супероксидного радикала перитонеальными макрофагами и нейтрофилами, а также на продукцию провоспалительных и противовоспалительных гуморальных факторов МНК ПК.
4. Исследовать иммуномодулирующие свойства комплекса на лабораторных животных *in vivo*.

Научная новизна работы.

Впервые получен комплекс кукурбит[7]урилла с пептидом тафтсином и получена константа комплексообразования $((2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1})$ данного соединения.

Впервые исследованы иммуномодулирующие свойства макроциклического кавитанда кукурбит[7]урилла.

Впервые исследовано влияние комплексообразования с кукурбит[7]урилом на биологические свойства иммуномодулирующего пептида тафтсина *in vitro*, в том числе впервые получены данные о влиянии комплекса на цитокинпродуцирующую способность МНК ПК: по сравнению со свободным пептидом, активирующим продукцию только ФНО α , комплекс повышал уровень спонтанной продукции всех исследуемых цитокинов (ФНО- α , ИЛ-2, ИНФ- γ и ИЛ-10). При стимулировании цитокинпродуцирующей способности МНК ПК при помощи КонА свободный пептид повышал продукцию только ФНО- α и не влиял на остальные цитокины, в то время как комплекс оказывал действие на все цитокины, повышая уровень ФНО- α и ИЛ-2, и снижая уровень ИНФ- γ и ИЛ-10.

Впервые изучено влияние комплекса кукурбит[7]урилла с тафтсином на способность клеток продуцировать супероксидный радикал, в частности, комплексообразование тафтсина с кукурбит[7]урилом не изменяет способности пептида стимулировать продукцию супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Впервые показано, что при коротком сроке культивации свободный тафтсин и комплексированный с кукурбит[7]урилом обладают схожим действием на фагоцитоз перитонеальных макрофагов, при увеличении же срока культивирования - более существенно, чем свободный пептид увеличивает фагоцитарную активность.

Впервые продемонстрировано, что комплексообразование с кукурбит[7]урилом не изменяет способность тафтсина повышать интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Впервые показано, что комплекс кукурбит[7]урила с тафтсином способен статистически значимо усиливать реакции гуморального иммунитета, повышая количество антителообразующих клеток в селезенке у лабораторных животных, по сравнению со свободным пептидом.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты вносят новый вклад в изучение защиты пептидных и белковых препаратов от биodeградации, основанной на образовании комплексов типа «гость-хозяин» с супрамолекулярными соединениями.

Результаты исследования расширяют представления о стабилизации пептидных препаратов путем использования различных систем модификации и доставки лекарственных средств при помощи супрамолекулярных соединений, в частности, кукурбит[7]урила.

Предлагаемый подход по модификации пептида тафтсина посредством комплексования с кукурбит[7] урилом с целью защиты от биodeградации может быть использован для создания препарата для клинического применения. Кроме того, разработанный подход может быть использован и для других пептидов, содержащих положительно заряженные аминокислотные остатки.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Кукурбит[7]урил образует комплекс «гость-хозяин» с пептидом тафтсином, константа комплексообразования, характеризующая стабильность комплекса, составляет $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

2. Комплекс кукурбит[7]урила с тафтсином обладает иммуномодулирующим действием как *in vitro*, так и *in vivo*.

Апробация материалов диссертации.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: XXII зимней молодежной научной конференции «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2010), XIV всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2011), 8-й отчётной конференции НИИКИ СО РАМН. «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике» (г. Новосибирск – 2011), на Объединенном иммунологическом форуме 2013 (г. Нижний Новгород, 2013). Апробация состоялась 24 июня 2015 года на семинаре НИИФКИ.

Объем и структура диссертации:

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 116 страницах машинописного текста, включающего 7 таблиц и 6 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 185 литературных источников, в том числе 148 зарубежных.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов работ соискателей ученой степени.

Самостоятельность выполненной работы.

Экспериментальные данные, приведенные в диссертационной работе, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Автор участвовал в обработке и обсуждении полученных результатов, в написании статей и представлении докладов на конференциях различного уровня.

Благодарности:

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю академику РАН, д.м.н., проф. Козлову В.А. за помощь и поддержку, сотруднику лаборатории химии кластерных и молекулярных соединений ИХН СО РАН к.х.н. Коваленко Е.А за предоставленные реактивы и консультирование, сотрудникам лаборатории исследования модификации биополимеров ИХБФМ СО РАН д.х.н. Федоровой О.С. и Канажевской Л.Ю за помощь с постановкой метода конкурентного флуоресцентного титрования. Реализация диссертационной работы была бы невозможна без всесторонней поддержки и активного участия в моделировании экспериментов д.м.н. Якушенко Е.В., Гришиной Л.В., Любимова Г.Ю. Всем им, а также многим другим сотрудникам НИИ клинической иммунологии СО РАМН автор выражает искреннюю признательность и благодарность.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биологически активные пептиды.

1.1.1. История исследования, применение, свойства пептидных препаратов.

Биологические свойства пептидов, по сравнению с белками, начали изучать сравнительно недавно, в 30х годах XX века. Интерес к исследованиям пептидов вновь возрос в первую очередь с открытием пептидных гормонов. Окситоцин и вазопрессин – первые биологически активные пептидные вещества, выделенные из нервной ткани (Овчинников, 1987). Структура этих нейрогормонов была подтверждена химическим синтезом – впервые осуществленным полным синтезом природных пептидов (Якубке и Ешкайт, 1985). Впоследствии было открыто множество пептидных соединений, обладающих биологическими функциями. К ним относятся нейропептиды, пептидные гормоны, пептидные токсины, пептидные антибиотики, пептиды с иммунорегуляторным действием, пептиды с вкусовыми качествами и т. д. Строгой структурно-функциональной классификации на сегодняшний день не существует поскольку зачастую пептиды обладают множественным действием.

В период 1944-1954 гг. были разработаны основные аналитические методы выделения, очистки и установления структуры пептидов. Однако исследования некоторых пептидов, особенно пептидов головного мозга, совершенно не развивались, так как были неизвестны соответствующие аналитические методы определения нанограммовых (10^{-9} г) или даже меньших количеств вещества. Лишь с развитием радиоиммунного анализа стали возможны определения исключительно малых концентраций пептидов в соответствующих препаратах (Якубке и Ешкайт, 1985). Например, некоторые гормоны можно обнаружить при содержании 10^{-12} г в 1 мл крови. Развитие радиоиммунного метода позволило начать изучение нейрогормонов

гипоталамуса. Гийемен и Шалли, получившие за данные исследования Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1977 г., смогли привести экспериментальные доказательства того, что центральная нервная система модулирует активность гипоталамуса путем выделения ничтожных количеств либеринов; тем самым контролируется эндокринная регуляция. Оба исследователя независимо друг от друга установили последовательность первых гормонов гипоталамуса и синтезировали их в лаборатории.

За последние годы число пептидов, найденных в живых системах, сильно возросло (под ред. Смирнова, 2003). Было обнаружено, что пептиды участвуют практически во всех физиологических процессах организма. Оказалось, что для воздействия на физиологические процессы необязательно наличие целой молекулы. Более того, в некоторых случаях фрагменты, состоящие всего из 3-4 аминокислотных остатков, были эффективнее, чем нативные соединения. Эти данные послужили предпосылкой к формированию представлений о том, что регуляция и координирование функций организма могут осуществляться за счет процессинга полипептидов, когда в зависимости от потребностей организма от достаточно длинных полипептидных цепей отщепляются фрагменты, обладающие той или иной степенью активности, специфичности и направленности действия на определенные физиологические системы. Для большинства регуляторных пептидов исследования шли в определенном порядке: 1) выделение белкового экстракта из определенной ткани или органа; 2) разделение смеси белков и пептидов с выделением наиболее биологически активной молекулы; 3) разделение белковой или пептидной молекулы на олигопептидные фрагменты и выявление среди них наиболее активного пептида.

В связи с все возрастающим числом пептидных лекарств и расширением областей их применения возникла необходимость исследований модификаций данных веществ, применяемых для улучшения лекарственных свойств. Поскольку большинство пептидов применяется в инъекционной

форме, основная часть таких исследований направлена на разработку методов защиты препаратов от биodeградации, что в перспективе позволит получение более удобных в применении альтернативных форм (Ali and Manolios, 2002).

Исследование пептидов не теряет своей актуальности на протяжении длительного времени. Вещества, заинтересовавшие в первую очередь как необходимые для определения структуры белков, привлекли внимание биологов своими универсальными регуляторными свойствами. Заслуживает внимание и практическое применение пептидов, ставшее возможным благодаря обширным фундаментальным химическим и биологическим исследованиям, проведенным в XX веке.

В настоящее время наибольший интерес для исследователей представляют биологически активные пептиды, обнаруженные в небольших концентрациях во всех органах и тканях живых организмов, и, несомненно, играющие важную регуляторную роль. На сегодняшний день выявлены некоторые закономерности, характерные для регуляторных пептидов.

Во-первых, у биологически активных пептидов есть свои особенности строения. Многие пептиды подвергаются посттрансляционной модификации, что объясняет их отличное от белков строение. Если первичная структура белка представляет собой линейную полипептидную цепь, то биологически активные полипептиды часто встречаются в циклической форме (например вазопрессин); в состав регуляторных пептидов могут входить не только протеиногенные аминокислоты, но и D- аминокислоты и другие природные аминокислоты (Manning *et al.*, 1993; Ollivaux *et al.*, 2014).

Во-вторых, как известно, подавляющее большинство регуляторных пептидов обладает полифункциональностью (под. ред. Смирнова, 2003). Другими словами, одно соединение обеспечивает регуляцию различных, часто физиологически несхожих функций. Так, например, селанк обладает иммуотропным и одновременно устойчивым анксиолитическим и

ноотропным эффектами (Козловская и др., 2002). В связи с этим, многие физиологические функции оказываются под контролем целого ряда регуляторных пептидов. Становится очевидной условность подразделения олигопептидов на нейро-, эндокрино- или иммуноактивные и одновременно на морфогенетически активные факторы (Замятнин, 1992).

В-третьих, биологически активные пептиды отличает наличие значимых групп. Основываясь на представлениях о сигнатурах (наборах функций), а также принципах эквивокации (несколько структур → одна сигнатура → одна функция) и двузначности (одна структура → несколько сигнатур → несколько функций), была сделана попытка дать общую характеристику функциональных особенностей эндогенных регуляторных олигопептидов, помогающую уяснить, почему структурно разные молекулы способны вызвать близкие, практически одинаковые реакции или почему одна молекулярная структура участвует в различных физиологических процессах (Чипенс, 1980; Quastler, 1965). Было предположено, что наличие двух типов функциональных групп - положительно заряженных и циклических, позволяет рассматривать одно из свойств сигнатуры как взаимное расположение этих групп в первичной структуре олигопептида.

Исходя из этого, можно представить значительное число структур, содержащих одинаковое расположение положительно заряженных и циклических аминокислотных радикалов, в то время как сами эти радикалы в разных молекулах будут принадлежать аминокислотным остаткам разного типа. Хорошо известными примерами такого рода среди радикалов являются взаимные замены остатков аргинина и лизина у членов одного олигопептидного семейства (Замятнин А.А., 1991). Более того, многочисленные возможные замены других аминокислотных остатков при сохранении расположения функциональных групп также могут приводить к одинаковой сигнатуре при разной первичной структуре. По-видимому, в этом и проявляется принцип эквивокации (Zamyatnin, 1991).

Основу принципа двузначности составляет высокая конформационная подвижность олигопептидов, в результате которой одна молекула принимает различные конформации (имеет несколько сигнатур), и этим обеспечивается пространственное соответствие с рецепторами различного типа (Замятнин, 1990).

Таким образом, наличие у регуляторных пептидов функционально значимых групп может обеспечивать универсальность данных молекул в качестве регуляторов.

Формирование концепции пептидной регуляции биологических функций организма с самого начала сопровождалось попытками применить полученную информацию для разработки новых высокоэффективных лекарств на основе регуляторных пептидов. На сегодняшний день можно выделить несколько наиболее развивающихся направлений в исследовании регуляторных пептидов:

1) Поиск новых лекарственных средств на основе пептидов. Число пептидных препаратов, применяемых в различных областях медицины, неуклонно возрастает. В настоящее время пептидные препараты применяются для гормональной терапии, при лечении злокачественных опухолей, в неврологии, для коррекции иммунного статуса, в качестве антибиотиков и т.д. (Pandey *et al.*, 2009; Mok end Li, 2014; Vesely, 2014).

2) Разработка методов, позволяющих избежать разрушения пептидов биологическими средами организма. К этому направлению относятся как поиск альтернативных путей введения, так и разработка способов защиты препаратов от действия пептидаз, включая химическую модификацию аминокислот, повышение гидрофобности, использование ферментных ингибиторов, применение усилителей абсорбции, использование различных переносчиков (микросферы, наночастицы, липосомы, эмульсии) и т.д. (Ali and Manolios, 2002; Cai *et al.*, 2014; Morishita and Peppas, 2006; Schultz *et al.*, 2015).

Следовательно, на сегодняшний день исследования пептидов остаются актуальными. Сформирована концепция регуляций биологических функций, высказано предположение о значении функциональных групп, но в то же время говорить о том, что пептиды и способы их модификации полностью изучены, рано.

1.1.2. Лекарственные средства на основе пептидов, применяемые в иммунологии.

Первыми пептидными препаратами, применяемыми в иммунологии, стали регуляторные пептиды центральных органов иммунитета: тимуса и костного мозга (под ред. Смирнова, 2003). В 60-70 гг. прошлого столетия в различных лабораториях мира из центральных органов иммунитета было получено около десятка различных пептидов. Часть этих пептидов обладала иммуномодулирующими и биорегулирующими активностями, присущими нативным экстрактам тимуса. Для российских исследователей наиболее известны три из них: тимозин, тактивин, тималин; два из которых: тактивин и тималин являются официально зарегистрированными в Российской Федерации лекарственными средствами.

Наиболее широко тимозин применяли при бактериальных, вирусных и грибковых инфекциях (Mutchnick *et al.*, 1991). В ходе двойного слепого плацебоконтролируемого опыта было показано, что у больных хроническим вирусным гепатитом В курсовое применение тимозина дважды в неделю на протяжении 6 месяцев сопровождалось достоверным увеличением содержания CD3 и CD4 лимфоцитов в периферической крови и активацией выработки ИНФ- γ .

Тактивин – комплексный препарат, содержащий пептиды с молекулярной массой от 1,5 до 6 кДа. В экспериментальных исследованиях и клинических наблюдениях тактивин эффективно восстанавливал сниженную или подавленную иммунологическую реактивность. Введение препарата мышам

линии СВА с индуцированной бензолом депрессией иммунитета восстанавливало количество НК-клеток и Т-киллеров до исходного уровня. Под влиянием тактивина повышалось содержание тимического сывороточного фактора и экспрессия дифференцировочных рецепторов лимфоцитов. Наилучшие результаты были получены при применении тактивина в составе комплексной терапии при радиационной иммунодепрессии кроветворения, при первичных иммунодефицитных состояниях (атаксия-телеангиэктазия, врожденные нарушения тимической регуляции), при лечении генерализованных форм герпеса (Арион, 1989).

Близкий по иммунологическим свойствам пептидный препарат тималин получен путем кислотного гидролиза тимуса крупного рогатого скота (Морозов, Хавинсон, 1981). При экспериментальном изучении тималина показана его способность модулировать процессы репопуляции дифференцировочных рецепторов лимфоцитов. В клинических целях тималин применяли при широком круге заболеваний.

Сравнительное исследование влияния экстрактов вилочковой железы показало, что независимо от методики их получения все они обладают близкими иммунобиологическими свойствами (Яковлев и др., 1992). Таким образом, можно с достаточным основанием утверждать, что пептидные препараты, выделяемые из тимуса, оказывают одинаковое иммуномодулирующее действие, независимо от методики их выделения. Это обстоятельство свидетельствует о том, что пептидные последовательности, содержащиеся в экстракте, имеют высокую степень гомологии.

Другим хорошо изученным тимическим иммуномодулятором является тимопоэтин, впервые выделенный в 1971 году (под ред. Смирнова, 2003). Из водно-солевого экстракта тимуса получены два пептида – тимопоэтин I и тимопоэтин II. Дальнейшее изучение тимопоэтина II показало, что это полипептид с молекулярной массой 5562 Да и изо-электрической точкой 5,5, состоящий из 49 аминокислотных остатков. Биологическую активность

тимопоэтина II связывают с пентапептидом, названным тимопентин (ТП-5), соответствующим 32-36 аминокислотным остаткам нативной молекулы тимопоэтина: *Arg-Lys-Asp-Val-Tyr*. Вместе с тем было показано, что некоторые проявления активности тимопоэтина сохраняются и у более коротких пептидов, состоящих из 4-х и даже 3-х аминокислотных остатков (Denes *et al.*, 1986).

В последствии выяснилось, что информация, необходимая для реализации иммунорегуляторных эффектов, может содержаться в небольших по размерам олигопептидах, содержащих малое количество аминокислотных остатков. Примером такого олигопептида является тимогексин (иммунофан), структура которого отличается от тимопентина наличием аминокислотных замен с элонгированием цепи концевым аргинином: *Arg-Asp-Lys-Val-Tyr-Arg*. Иммунофан представляет собой синтетический гексапептид, аналог участка 32-36-тимопоэтина. Изучение механизма действия показало, что иммунофан: восстанавливает продукцию тимического гормона тимулина (у тимэктомированных мышей — до значений, характерных для нормальных животных); усиливает в опытах *in vitro* и *in vivo* выработку ИЛ-2 лимфоцитами, стимулированными Т-митогенами; оказывает иммуномодулирующее действие на продукцию ФНО α , т. е. повышает пониженное и понижает повышенное его образование; стимулирует *in vitro* образование IgG, IgA, IgM, причем стимуляция синтеза IgA происходит в культуре лимфоцитов, полученных от больных селективным IgA-дефицитом; ингибирует *in vitro* образование IgE в культурах лимфоцитов, полученных из периферической крови больных с аллергиями; обладает адьювантным эффектом, что проявляется в повышении иммуногенности вакцин против клещевого энцефалита и гепатита А (Лебедев, Шелепова, 1998). При проведении клинических испытаний иммунофан показал себя высокоэффективным средством в плане восстановления нарушенной иммунологической реактивности при хронических бактериальных и

вирусных инфекциях, хирургических инфекциях, онкологических заболеваниях (Величко, 2005; Григорьева, 2007; Иллек и др., 2007).

Дальнейшее развитие идеи пептидных тимомиметиков привело к пониманию того факта, что для индукции регуляторного сигнала и системе может быть достаточно минимального пептида, состоящего всего из небольшого количества аминокислотных остатков. Интенсивное исследование регуляторных пептидов за последние 2-3 десятилетия привело к кардинальному пересмотру представлений о механизмах регуляции физиологических функций, принципов координации процессов гомеостаза и адаптации функциональных систем организма к окружающей среде. Оказалось, что для воздействия на физиологические процессы необязательно наличие целой молекулы. Более того, в некоторых случаях фрагменты, состоящие всего из 3-4 аминокислотных остатков, были эффективнее, чем нативные соединения. Эти данные послужили предпосылкой к формированию представлений о том, что регуляция и координирование функций организма могут осуществляться за счет процессинга полипептидов, когда в зависимости от потребностей организма от достаточно длинных полипептидных цепей отщепляются фрагменты, обладающие той или иной степенью активности, специфичности и направленности действия на определенные физиологические системы.

Если проанализировать аминокислотную последовательность тимозинов, тимопоэтинов и других тимических пептидов, а также ряда интерлейкинов, то можно увидеть, что в их структуре часто встречается дипептид, состоящий из остатков лизина и глутаминовой кислоты. Этот факт был использован В.Х. Хавинсоном и сотрудниками для создания нового иммуномодулятора лизил-глутамин, получившего наименование «Вилон» (Хавинсон и др., 1997). Экспериментальное изучение вилона показало его способность усиливать реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей, индуцированную тринитробензо-сульфокислотой (Морозов и др., 2000).

Вилон стимулирует образование антителобразующих клеток в селезенке мышей, иммунизированных эритроцитами барана, а также активирует репаративные процессы, нормализует число лимфоцитов после радиационно-ртутных воздействий, способствует активации экспрессии генов, которая снижается со старением в связи с гетерохроматинизацией (Иванов и др., 2005; Кузник и др., 2008; Обыденко и др., 2009; Хавинсон и др., 2002; Khavinson *et al.*, 2004).

Другим дипептидом, обладающим тимомиметическими свойствами, является глутамил-триптофан, известный под названием «Тимоген». Первоначально дипептид был выделен из тималина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а затем синтезирован несколькими методами (под ред. Смирнова, 2003). Долгое время считалось, что этот дипептид может содержаться в молекуле гормона тимуса. К сожалению, выделить и идентифицировать полную молекулу этого гормона так и не удалось, но в тех ее фрагментах, которые на сегодняшний день известны, такой дипептид не найден. Тимоген является самостоятельным дипептидом, воспроизводящим некоторые свойства тимозинов, но не имеющим с ними структурных аналогий. Логично ожидать появления и других коротких пептидов, способных регулировать те или иные реакции иммунной системы.

Исследованы и другие пептиды, обладающие иммунными свойствами. Миелопид (комплекс из шести костномозговых миелопептидов небольшой длины - 4-8 аминокислотных остатков) является медиатором гуморального звена иммунитета, стимулирует процессы пролиферации и дифференцировку иммунокомпетентных клеток, активирует различные компоненты иммунной системы и фагоцитоз, регенерацию тканей после хирургической травмы (Фонина и др., 1998; Суковатых и др., 2012). Свойства миелопептидов внутри группы различались: МП1 обладал иммунокорегулирующим действием, МП2 –

противоопухолевым, МП4 – стимулировал фагоцитоз, МР4 – усиливал дифференцировку клеток в костном мозге (Петров и др., 2005).

Гепон — синтетический тетрадекапептид, копирующий фрагмент 324-337 шарнирной области эзрина. Известно, что белок эзрин активно участвует в процессах движения клетки, в образовании контакта клетки с другими клетками и внеклеточным матриксом, в поддержании формы клетки, а также в передаче сигналов активации с клеточной мембраны на уровень генов, определяющих функционирование клетки. Действуя на клетки иммунной системы, гепон активирует определенные механизмы иммунитета и потому относится к фармакологической группе иммуномодуляторов (Катлинский и др., 2003). Иммуномодулирующие свойства гепона проявляются следующим образом: он индуцирует интерфероны, активирует нейтрофилы, активирует моноциты и привлекает их в зону воспаления, усиливает синтез антител против чужеродных антигенов, повышает эффективность иммунной защиты от инфекций (Атауллаханов и др., 2002; Атауллаханов и др., 2003; Новокшенов и др., 2003).

Тафтсин – короткий пептид, состоящий из четырех аминокислотных остатков (Thr-Lys-Pro-Arg) Образуется в организме при расщеплении домена C_{H2} IgG, после чего стимулирует активацию фагоцитов и усиливает фагоцитоз. Действие тафтсина не ограничивается активацией переваривающей активности фагоцитов. Он обладает иммуномодуляторным эффектом (Перельмутер и др., 2004) и способен вызвать широкий спектр изменений биологической активности целого ряда клеток, обладающих рецепторами к нему. Так, тафтсин оптимизирует клеточную кооперацию макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, усиливает гемопоэз в костном мозге. Обнаружено, что эффект активации тафтсином цитотоксической способности НК-клеток сохраняется более 18 ч. Иммунокомпетентные клетки человека при поглощении тафтсина и его аналогов способны выделять ИНФ- γ и ФНО- α . Кроме того, было показано, что тафтсин и его аналоги оказывают

стимулирующее влияние на поведенческие реакции, ослабляет реакции страха и тревоги, усиливает исследовательское поведение животных, в открытом поле, оказывает модулирующее влияние на двигательную активность, улучшает процессы обучения и памяти (Kozlovskaya *et al.*, 2000; Семенова и др., 1989; Семенова и др., 1988).

Известно, что нервная и эндокринная системы модулируют функции иммунной системы с помощью нейротрансмиттеров, нейропептидов и гормонов, а иммунная система взаимодействует с нейроэндокринной системой с помощью цитокинов, иммунопептидов и других иммуотрансмиттеров. В настоящее время установлена роль эндогенных пептидов в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма в ответ на стресс и нарушения гомеостаза. Таким образом, система пептидов рассматривается в качестве универсальной во всем множестве нейроиммуноэндокринных взаимодействий (Dardenne, 1999; Fabry *et al.*, 1994; Siemion *et al.*, 2005).

1.1.3. Негативные факторы, возникающие при применении белковых либо пептидных препаратов.

Большинство пептидов и белков имеют короткий срок существования *in vivo*, в системе кровообращения период полураспада составляет несколько минут (Shechter *et al.*, 2007). Это особенно актуально для негликозилированных белков и пептидов с молекулярной массой менее 50 кДа. Кроме того, большинство пептидных и белковых препаратов не может применяться перорально, разрушаясь ферментами ЖКТ, поэтому возникает необходимость проведения частых инъекций, неудобная для пациента и медицинского персонала и повышающая риск осложнений (Tan *et al.*, 2010). Следовательно, удлинение срока жизни терапевтически активных пептидных препаратов в кровеносной системе имеет первостепенное клиническое значение.

Еще одним важным недостатком вводимых пептидных препаратов является их повышенная концентрация в кровеносной системе вскоре после применения, которая может превысить терапевтическую дозу в 100-1000 раз. Такая передозировка может привести к нежелательным побочным эффектам, таким как чрезмерная стимуляция или снижение экспрессии рецепторов.

На сегодняшний день существует несколько стратегий, позволяющих снизить проявления негативных факторов и избежать биodeградации белкового или пептидного препарата. Первая предусматривает виды введения препарата, вторая основана на стабилизации препарата путем применения различных техник доставки лекарственных веществ.

1.1.4. Защита от биodeградации путем применения альтернативных методов введения пептидных препаратов.

Применение препарата локально без необходимости циркуляции в большом круге кровообращения снижает вероятность развития иммунного ответа и разрушения лекарства пептидазами. Такими способами являются ректальный, буккальный, назальный, трансдермальный, легочный, глазной и др. (Amaro *et al.*, 2015; Dulal P., 2010; Kamei and Takeda-Morishita, 2015). Местное применение лекарственного вещества не всегда возможно, поскольку зачастую требуется не локальное воздействие препарата, а системное воздействие на весь организм. Для системного воздействия применимы стандартные пероральный и инъекционный способы введения.

1.1.5. Стабилизация пептидных препаратов путем использования различных систем доставки лекарственных средств.

Использование систем доставки лекарственных средств может предоставлять следующие преимущества: повышение растворимости белка или пептида; обеспечение контролируемого высвобождения молекул препарата; снижение риска развития нежелательных побочных эффектов;

защита от биодegradации под действием агрессивных сред организма; обеспечение адресной доставки в пораженные ткани *in vivo*. Применяемые стабилизаторы пептидных препаратов теоретически должны уменьшить скорость клиренса последних из системы кровообращения, что позволит вводить более низкие объемы или концентрации препарата (Tan *et al.*, 2010).

На сегодняшний день существует множество различных систем, разработанных для доставки белковых и пептидных препаратов (Jain *et al.*, 2013). Наночастицы из биоразлагаемых полимеров, таких как полимолочная кислота, поликапролактон, сополимеры гликолиевой и молочной кислот, сополимеры фумарового и себаинового ангидридов хитозана, модифицированный хитозан, а также липиды, показали большой потенциал в адресной доставке и защите белковых пептидных лекарственных веществ от биодegradации. Также различными исследователями применялись для схожей цели инкапсулирование препаратов в полупроницаемые мембранные структуры, такие как липосомы, ПЭГирированные липосомы, ниосомы и аквасомы. Кроме того, для стабилизации белковых и пептидных препаратов часто используются ПЭГирирование, ковалентно связывающиеся с препаратом носители, а также супрамолекулярные соединения, формирующие с препаратом комплексы типа «гость-хозяин».

Наночастицы - это твердые и сферические структуры размером около 100 нм, полученные из природных или синтетических полимеров. Лекарственный препарат может быть фиксированным или инкапсулированным внутри полимерной матрицы, адсорбированным либо конъюгированным на поверхности наночастицы. Использование наночастиц позволяет осуществлять адресную доставку широкого спектра разнообразных препаратов, таких, как гидрофильные либо гидрофобные лекарственные средства с небольшим размером молекулы, вакцины и биологические макромолекулы (Sadat *et al.*, 2014). Для регулируемой доставки в организме необходима персистенция наночастиц в системном кровотоке, однако

организм определяет гидрофобные частицы как чужеродные (Kumari *et al.*, 2010). Ретикулоэндотелиальная система удаляет их из потока крови, и частицы скапливаются в печени или селезенке. Этот процесс является одним из основных биологических барьеров для наночастиц при адресной доставке лекарственного средства. Связывание белками-опсонинами, присутствующими в сыворотке крови, вызывает привлечение к опсонизированным частицам макрофагов и, следовательно, их интернализации в процессе фагоцитоза. Поэтому существует необходимость защиты наночастиц от фагоцитоза, которая может осуществляться при помощи химической модификации поверхности наночастицы (Mahapatro and Singh, 2011).

Используемые для основы наночастицы полимеры могут быть линейными, разветвленными или шаровыми, и их размер может быть надежно проконтролирован в процессе синтеза. В качестве полимерного матрикса различными авторами предполагалось использовать полиамиды, полиакрилаты, сложные полиэфиры, полиортоэфиры, полиуретаны, полиакриламиды, поликапролактон, полимолочная кислота, полигликолевая кислота, сополимеры гликолевой и молочной кислот и др. (Jain, 2000; Panyam and Labhasetwar, 2012). Особое внимание в данном случае заслуживают частицы на основе полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты или сополимеров молочной и полигликолевой кислот, поскольку эти полимеры характеризуются исключительной биосовместимостью и способностью к биodeградации в организме (Wickline *et al.*, 2006).

Использование наночастиц позволяет решить множество проблем, связанных с использованием белковых и пептидных препаратов. Биоразлагаемые полимерные наночастицы на основе сополимеров гликолевой и молочной кислот широко используются для замедленного высвобождения в организме белков и пептидных лекарственных средств (Ansary *et al.*, 2014). К примеру, одна из главных проблем при обычном

введении инсулина - это риск тяжелой гипогликемии, поскольку концентрация инсулина в крови резко возрастает. Применение наночастиц на основе сополимеров гликолевой и молочной кислот *in vivo* устраняло острый гипогликемический пик после введения раствора инсулина, обеспечивая у крыс устойчивое длительное снижение уровня сахара в крови, связанное с замедленным высвобождением лекарственного препарата (Varichello *et al.*, 1999). Однократная инъекция полимерных микросфер, загруженных рекомбинантным человеческим эритропоэтином, приводит у крыс к повышению концентрации гемоглобина и эритроцитов в крови на протяжении 33 дней (Jintian *et al.*, 2011).

Поскольку получаемые при биоразложении в организме денатурированные или агрегированные формы белка либо пептида будут не только терапевтически неактивными, но и могут проявлять токсические или иммуногенные свойства, в течение последних двух десятилетий были разработаны различные подходы для устойчивого и полного освобождения белка в нативной форме из наночастиц. К примеру, добавление человеческого сывороточного альбумина и NaHCO_3 в процессе приготовления частиц стабилизирует рекомбинантный человеческий гормон роста внутри наночастиц на основе сополимеров гликолевой и молочной кислот, при этом активная форма препарата поддерживается в крови экспериментальных животных в концентрации не ниже 10 нг/мл в течение 30-дневного периода после однократного внутримышечного введения полимерной композиции. (Rafi *et al.*, 2010). Добавление различных солей цинка (оксид цинка, карбонат цинка, ацетат цинка) в состав микросфер для стабилизации инсулина достоверно повышает стабильность препарата и препятствует деградации и образованию агрегатов (Chandrasekar and Jagdish, 2009).

Применение наночастиц возможно и для создания пероральных форм белковых и пептидных препаратов, поскольку позволяет решить проблемы,

связанные с прохождением препарата через ЖКТ. Для перорального введения инсулина была разработана наночастица на основе сополимеров гликолевой и молочной кислот, в которую был инкапсулирован инсулин совместно с антацидом (Sharma *et al.*, 2013). Полученные наночастицы исследовались *in vitro* и *in vivo*. Исследования *in vitro* показали, что инкапсулированный инсулин был хорошо защищен в условиях, смоделированных при помощи желудочного и кишечного соков. Из теста *in vivo* следовало, что в модели диабета на крысах при введении наночастиц перорально при дозе инсулина 120 МЕ/кг достигается эквивалентный уровень глюкозы в крови, соответствующий введению подкожно 20 МЕ/кг раствора инсулина. Исследователи пришли к выводу, что для успешного перорального введения белковых препаратов необходимы дальнейшие модификации, требуется увеличить максимальную концентрацию в плазме в ответ на введение определенного количества препарата и уменьшить время достижения максимальной концентрации в плазме.

Несмотря на все достоинства наночастиц, перспективы их использования в качестве носителей для лекарств омрачаются наличием нескольких «подводных камней»: во-первых, зачастую связывание лекарств с наночастицами довольно низкое, что снижает их эффективность в качестве носителя, во-вторых, при попадании в организм может происходить мгновенное высвобождение препарата, поэтому большая часть препарата не достигает цели при адресной доставке, быстро подвергаясь биодegradации в организме, в-третьих, в процессе биоразложения полимеров в организме могут выделяться небезопасные вещества (Sadat *et al.*, 2014).

Одними из наиболее исследованных систем доставки лекарств являются липосомы. Липосомы представляют собой небольшие искусственные пузырьки размером от 0,0025 мкм до 2,5 мкм, которые могут быть получены из холестерина и природных нетоксичных фосфолипидов (Akbarzadeh *et al.*, 2013). Из-за их размера и сочетания гидрофобных и гидрофильных

компонентов, липосомы являются перспективными для доставки лекарственных средств, обеспечивая направленность транспортировки, постепенное высвобождение и защиту от биodeградации в организме. Свойства липосом значительно различаются в зависимости от липидного состава, поверхностного заряда, размера и способа приготовления.

Преимущества и ограничения применения липосом как переносчиков лекарственных средств зависят в значительной степени от взаимодействия липосом с клетками после введения и стабильности в организме. В условиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что основное взаимодействие липосом с клетками сводится либо к адсорбции, зависящей от специфического связывания с клеточной поверхностью компонентов липосом, электростатических сил, неспецифическим взаимодействием гидрофобных молекул, либо к эндоцитозу, обеспечиваемому фагоцитарной активностью клеток ретикулоэндотелиальной системы, например, макрофагов и нейтрофилов (Akbarzadeh *et al.*, 2013). Поскольку липосомы поглощаются клетками ретикулоэндотелиальной системы, они так же, как и наночастицы, будут накапливаться в селезенке, печени, лимфоузлах, а доставка в другие ткани будет затруднена. Кроме того, к недостаткам липосом относятся низкая растворимость в биологических жидкостях, короткий период полураспада, возможность окисления фосфолипидов, риск утечки либо слипания инкапсулированных лекарственных молекул.

Однако, несмотря на ряд недостатков, пептидные и лекарственные средства, инкапсулированные в липосому, показывают высокую эффективность по доставке препаратов в клетку и защите от биodeградации *in vitro*. После инкубации липосом, нагруженных проапоптотическими мембранными белками, с клетками колоректальной карциномы, в течение 24 ч индуцировался апоптоз опухолевых клеток, что говорит о возможности использования таких липосом в терапии рака (Liguori *et al.*, 2008). Тем не менее, необходимо также определение эффективности таких частиц *in vivo*,

поскольку использование липосом в организме зачастую не оказывает такого же эффекта, какой наблюдался в пробирке.

Использование липосом с полиэтиленгликолем (ПЭГ) предоставляет несколько преимуществ по сравнению с обычными липосомными частицами, включая предотвращение опсонизации *in vivo* и повышение нагруженности липосомы лекарственными пептидами либо протеинами. Пегилированные липосомы показали высокий уровень инкапсуляции инсулина в частицу по сравнению с непегилированным вариантом (Park *et al.*, 2011). Также *in vitro* наблюдалось более эффективное проникновение в клетки пегилированных липосом, нагруженных IL-2, по сравнению с непегилированным аналогом (Kedar *et al.*, 2000). Схожим с липосомальной структурой строением и принципом действия обладают разработанные для доставки лекарства частицы – ниосомы и аквакомы.

Ниосомы – сравнительно новая система доставки лекарственного средства, в котором препарат заключен в двухслойные везикулы (Makeshwar and Wasankar, 2013). Конструктивно ниосомы аналогичны липосомам, которые также состоят из бислоя. Тем не менее, бислоем в случае ниосомы состоит из неионных поверхностно-активных веществ, а не фосфолипидов, как в случае липосом. В настоящее время ведется исследование возможности использования ниосом в качестве носителя белковых и пептидных препаратов, защищающего препараты от биodeградации в желудочно-кишечном тракте под действием ферментов. В исследовании *in vitro* показано, что включение в состав ниосомы препарата вазопрессина значительно увеличило стабильность пептида.

Аквакомы также являются одной из наиболее недавних разработок среди различных систем доставки биологически активных молекул, таких как пептиды, белки, гормоны и антигены (Jain *et al.*, 2012). Аквакомы – это частицы сферической формы размером 60-300 нм. Аквакомы представляют собой самоорганизующуюся систему, состоящую из трех слоев, внутри

которой находится твердофазный нанокристаллический сердечник, покрытый олигомерной пленкой с адсорбированными биохимически активными молекулами. Твердое ядро обеспечивает структурную стабильность, в то время как углеводная пленка защищает от обезвоживания и стабилизирует биологически активные молекулы. Аквасомы успешно применяются для защиты от биodeградации и адресной доставки инсулина, гемоглобина и различных ферментов.

Одной из систем, применяемых для защиты от биodeградации и повышения эффективности лекарственных препаратов белковой структуры, является химическая модификация их молекулы, состоящая не в собственно изменении их структуры, а в физико - химической трансформации, достигаемой соединением нативной молекулы с уже упомянутым выше ПЭГ (Tsubery *et al.*, 2004). Данный процесс соединения нативной молекулы лекарственного препарата с ПЭГ получил название "пегилирование". Подобная химическая модификация фармакологических препаратов пептидной структуры адресно направлена на улучшение их переносимости, снижение иммуногенности, повышение периода их полужизни, и как следствие всего перечисленного, на значительное повышение качества процесса проведения лечения.

На сегодняшний день существуют различные модификации пептидных и белковых препаратов при помощи ПЭГ, значительная часть из которых находится на определенных стадиях клинических испытаний, а некоторые уже разрешены к применению в клинической практике.

Наиболее известные на сегодня пегилированные формы интерферона α (пегилированный интерферон альфа-2а и ПЭГинтерферон альфа-2b). Пегилированные формы интерферона α производятся биосинтетическим методом по технологии рекомбинантной ДНК и являются производным продуктом клонированных генов человеческого лейкоцитарного интерферона, введенных и экспрессирующихся в клетках *E. coli*.

ПЭГинтерфероны- α имеют значительно лучший биологический профиль, нежели обычный интерферон- α ; это выражается значительным повышением периода полужизни ПЭГилированного аналога, снижением его иммуногенных свойств (Glue *et al.* 1999).

Аденозиндезаминаза - это фермент, недостаток которого приводит к развитию первичного иммунодефицита, при использовании на практике в качестве лекарственного препарата аденозиндезаминаза очень быстро метаболизируется и свободно выводится почками. Доклинические исследования в эксперименте продемонстрировали, что связывание, например, коровьей аденозиндезаминазы с низкомолекулярными цепями ПЭГ до 10 - 16 kDa вызывает значительное повышение времени полужизни пептида - от нескольких минут до 24 часов, и что особенно важно, при этом происходило также значительное снижение иммуногенности препарата. Клинические результаты с генноинженерной аденозиндезаминазой в составе ПЭГ - конъюгата продемонстрировали, что период полужизни при сохранении всех биологических эффектов аденозиндезаминазы составляет от 48 до 72 часов при введении препарата внутримышечно еженедельно. Данный режим введения конъюгата "ПЭГ - аденозиндезаминаза" позволяет добиться концентрации аденозиндезаминазы в сыворотке крови в три раза выше по сравнению со значением у здоровых детей. Использование ПЭГ - аденозиндезаминазы в шести независимых контролируемых рандомизированных исследованиях продемонстрировало хороший профиль безопасности препарата, при этом значительно реже отмечалось развитие оппортунистических инфекций, реабилитация пациентов занимала меньше времени; ни одного случая токсических реакций или других серьезных нежелательных явлений при этом выявлено не было. (Hershfield *et al.* 1987).

ПЭГ-модификация пептидных препаратов, предопределившая серьезные изменения в результаты лечения, наметила сегодня большие перспективы при таких заболеваниях, как ферментные дефициты, лейкемия, хронические

воспалительные заболевания, онкология, хронические вирусные инфекции, сердечно-сосудистая патология (Bruce *et al.*, 2001). ПЭГилирование лекарственных препаратов пептидной структуры имеет ряд весомых и несомненных преимуществ, которые ранее были просто невозможны при использовании нативных аналогов: усиление биологической активности, удлинение периода "эффективной" полужизни, замедление выведения, отсутствие пиков плазменной/тканевой концентрации, понижение токсичности и иммуногенности. Однако было бы неверным считать, что ПЭГилирование приносит только позитивный результат, а ПЭГ-конъюгаты имеют одни только преимущества перед нативными пептидами. К основным недостаткам ПЭГ-конъюгированных пептидов, используемых и в качестве уже разрешенных лекарственных форм, и в продолжающихся клинических испытаниях, можно отнести уменьшение активности белка, возможно связанное с выбором "неправильного" размера или структуры ПЭГ; с этой же причиной может быть связано и возможное удлинение элиминации пептида (Reddy *et al.*, 2000).

Кроме ПЭГ, защиту от биodeградации могут осуществлять и иные связанные с пептидным препаратом структуры. В качестве ковалентно связанного с препаратом носителя чаще всего выступают проникающие пептиды (Олферьев и др. 2003). Данные пептиды позволяют решить проблему доставки больших молекул, таких как белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, в клетки через клеточную мембрану (клеточное поглощение). Механизм транспорта проникающих пептидов через клеточную мембрану в настоящее время не понятен. Однако известно, что он происходит без участия мембранных белков, практически не зависит от характера экспрессии углеводов и энергетически независим. Оказалось, что данные пептиды могут переносить через клеточную мембрану связанные с ними ковалентно аминокислотные и олигонуклеотидные последовательности с молекулярной массой до нескольких килодальтон, после чего попавшие в

клетку соединения длительное время не подвергаются внутриклеточному гидролизу, т.к. находятся вне зоны действия лизосомальных ферментов и тем самым защищены от биodeградации. Таким образом, проникающие пептиды могут выступать в роли транспортеров физиологически активных участков макромолекул в цитоплазму и даже в ядро клетки.

На различных клеточных линиях *in vitro* показано, что проникающие пептиды позволяли осуществить доставку через клеточную мембрану в цитоплазму клетки различных белков и пептидов на различных клеточных линиях (Олферьев и др. 2003; Anderson *et al.*, 1993). Однако эксперименты *in vivo* с проникающими пептидами, ковалентно связанными с белковым препаратом, в отличие от опытов *in vitro*, продемонстрировали низкий уровень доставки белковых лекарств в клетку (Niesner *et al.*, 2002).

Перспективным направлением в разработке систем доставки пептидных и белковых препаратов является образование комплексов «гость-хозяин». Комплексы пептидных препаратов, формирующиеся по типу «гость-хозяин», могут быть получены с различными супрамолекулярными соединениями: циклодекстринами, каликсаренами, кукурбитурилами, кроун-эфирами, криптофанами, пиллараренами и др.

Каликсарены — это макроциклические соединения, продукты циклической олигомеризации фенола с формальдегидом. Название каликсарен происходит от латинского слова «calix» - чаша, что отображает особенную форму молекулы, и слова «agene», указывающее на ароматический строительный блок, повторяющийся в структуре данного соединения. Благодаря наличию внутренней полости, объём которой в среднем равен 10 кубическим ангстремам, молекулы каликсарена способны образовывать комплексы типа «гость-хозяин». В экспериментах *in vitro* и *in vivo* большинство каликсаренов демонстрируют низкую токсичность, что позволяет использовать данные соединения для создания новых лекарственных форм (Rodik *et al.*, 2009).

Структурные особенности каликсаренов, такие как пластичность конформации и способность к многообразным взаимодействиям посредством использования различных лигандов на верхней или нижней части «чаши», делают эти молекулы привлекательными для исследований возможности связывания с белковыми и пептидными препаратами, вследствие которой лекарственный препарат будет защищен от биodeградации под действием ферментов. Многие каликсарены, как было показано, обладают потенциалом действия в качестве ингибиторов различных ферментов, в том числе и химотрипсина (Park *et al.*, 1999).

Циклодекстрины (CD) на сегодняшний день имеют большое значение в супрамолекулярной химии, используясь как в новейших теоретических разработках, так и на практике. CD являются циклическими олигосахаридами, составленными из нескольких единиц глюкопиранозы, связанных друг с другом с помощью α -D-1,4-гликозидных связей (Yeguas *et al.*, 2011). Циклодекстрины из шести (α -CD), семи (β -CD), и восьми (γ -CD), единиц являются наиболее распространенными. Они имеют форму усеченного конуса с гидрофобной полостью, в то время как внешние поверхности конуса будут гидрофильными в результате наличия гидроксильных групп как на узкой (первичные гидроксильных группы), так и на широкой стороне порталных областей (вторичные гидроксильные группы). CD способны образовывать комплексы включения типа «гость-хозяин» с различными гидрофобными гостевыми молекулами, и, таким образом, они хорошо подходят для практического применения в промышленности, в частности, в фармацевтической (Pandey *et al.*, 2010). На сегодняшний день структуры комплексов «гость-хозяин» CD с аминокислотами, пептидами и белками были изучены несколькими авторами с использованием различных физических и химических методов исследований. Было показано, что взаимодействие в данном случае в основном происходит из-за включения в полость CD гидрофобных

ароматических аминокислотных остатков (Horský and Pitha, 1994; Gere-Paszti *et al.*, 2005).

Циклодекстрины имеют низкую токсичность, поэтому могут применяться для маскировки неприятного вкуса лекарств, предотвращения агрегации, снижения иммуногенности и изменений функций, использоваться в качестве защиты от биодegradации из-за гидролиза или расщепления ферментами в пищеварительном тракте (Irie and Uekama, 1997). Поскольку циклодекстрин преимущественно связывается с гидрофобными аминокислотами, его применение не позволит препятствовать разрушению всем спектром ферментов, обеспечивая лишь защиту в основном от ферментов, специфичных к гидрофобным аминокислотным остаткам.

На сегодняшний день имеются данные о положительном влиянии комплексообразования гидроксипропил- β -циклодекстрина (DM- β -CD) на белковые и пептидные препараты, проявляющиеся в увеличении абсорбции кальцитонина, глюкагона, инсулина и рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. DM- β -CD (5%) повышал абсорбцию вводимого интраназально кальцитонина у крыс и кроликов. Также на кроликах показано, что применение назального спрея из жидких и порошковых составов глюкагона, содержащих DM- β -CD улучшало биодоступность (> 80%) глюкагона по сравнению с подкожным введением. Биодоступность инсулина у крыс была также увеличена до 100% при назальном введении препарата с DM- β -CD (от 3% до 5%). (Verhoef *et al.*, 1994).

1.2. Кукурбитурил как комплексообразующее вещество

1.2.1. Общая характеристика и свойства кукурбитурилов.

Кукурбитурил (CB[n]) – это макроциклический кавитанд, способный на включение в свою полость различных молекул (или их фрагментов), образуя комплексы «гость- хозяин» (Герасько и др., 2002; Behrand *et al.*, 1905; Day *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 1981; Kim, 2002). Характер включаемых молекул определяется свойствами кукурбитурила: радиусом портала, размером полости, гидрофобностью и т.д. Изучение обратимого включения “гостей” в полость молекулы “хозяина” вносит существенный вклад в развитие исследований по актуальной в последнее время проблеме транспорта лекарств в живых системах.

Строение молекулы кукурбитурила — $C_{6n}H_{6n}N_{4n}O_{2n}$ ($n = 5 - 10$) — напоминает тыкву или бочку, по верхнему и нижнему ободу которой (т. е. в областях дна и крышки) располагаются атомы кислорода сильно поляризованных карбонильных групп (порталы) (Smeets *et al.*, 1987; Pichierri *et al.*, 2006). Молекулы данной группы имеют одинаковую высоту – 9,1 Å, но разные внешние и внутренние диаметры. Внутренний диаметр полости варьирует от 5 Å, что достаточно для содержания небольших молекул (либо фрагментов молекул) и ионов. Важным стерическим барьером для «гостевых» молекул является радиус портала (приблизительно 2 Å) (Marquez *et al.*, 2004). Существенным параметром является также объем полости, составляющий для CB[5], CB[6], CB[7] CB[8] и CB[10] соответственно 82, 164, 279, 479 и 870 Å³ (Lee *et al.*, 2003).

Одна из основных проблем, стоящих перед изучением CB[n] – это их плохая растворимость в воде и органических растворителях. CB[6] и CB[8] практически нерастворимы, а CB[5] и CB[7] растворимы. В чистой воде растворимость CB[6] составляет всего лишь 0,05 мМ. В большинстве исследований комплексообразования для увеличения растворимости CB[6] используют раствор HCO₂H/H₂O (1:1). Известно, что связывание CB[6] с

катионами щелочных и щелочноземельных металлов в чистой воде приводит к увеличению концентрации растворимой формы. Например, растворимость СВ[6] резко увеличивается при добавлении Na_2SO_4 (66 мМ), LiCl (0,94 мМ), KCl (37 мМ), CsCl (59 мМ), CaCl_2 (70 мМ). Поскольку биологические среды содержат достаточное количество ионов, растворимость в них СВ[6] значительно повышается, составляя в желудочном соке, кишечном соке и плазме крови 1-4 мМ, 5-7 мМ и 33-37 мМ соответственно (Walker *et al.*, 2010).

Среднее значение связывающей способности (понятие используется в характеристике отношений гость- хозяин, антиген-антитело, рецептор- лекарство, фермент-субстрат) для СВ[6] при исследовании связи с 56 гостевыми молекулами – $K_a = 10^{3.8} \pm 1.5 \text{ M}^{-1}$ (Mock and Shin, 1986; Wheate *et al.*, 2006). Сравнение комплексов СВ[6] и α -циклодекстрина (также способного к комплексообразованию «гость - хозяин») показало, что СВ[6] образует более прочные связи (за исключением гексанола) с молекулами, обладающими положительным зарядом (Buschmann *et al.*, 2000, Fujiwara *et al.*, 1987).

Комплексообразование СВ[6] обладает рядом характеристик, по аналогии применимых для всего семейства. Поскольку порталы молекулы имеют некоторый отрицательный заряд, то в этих областях происходит образование ассоциатов с положительно заряженными частицами (Lagona *et al.*, 2005). В области полости происходит связывание гидрофобных молекул и их частиц. Относительная подвижность и близкое расположение областей связывания (двух для положительно заряженных групп и одной для гидрофобных остатков) придает высокую селективность при связывании с кукурбитурилами с образованием комплексов по типу «гость-хозяин». При исследовании констант связывания ряда алкиламмониевых ионов с СВ[6] в растворе $\text{HCO}_2\text{H}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) были получены значения от 10^1 до 10^7 M^{-1} (Mock and Shin., 1986). Данный эксперимент выявил две характеристики комплексообразования для СВ[6]: в районе порталов расположена катион-

связывающая область, а внутри полости – гидрофобная область. Предпочтение кукурбитурилом положительно заряженных гостевых молекул может быть перенесено на других членов семейства СВ[n], но вклад электростатических взаимодействий относительно гидрофобного эффекта может измениться в случае увеличения размера полости.

Кроме структурных особенностей, необходимых для связывания (положительного заряда для взаимодействия в области порталов и гидрофобной структуры для проникновения внутрь полости), для гостевой молекулы будут важны также некоторые другие характеристики. В первую очередь, это длина последовательности. Из алкиламинов СВ[6] предпочитает связываться с бутиламино, тогда как с пропиламино значение константы связывания меньше в 8 раз, а с пентиламино в 4 раза. Из алкандиаминов пентандиамин и гександиамин связываются более селективно относительно бутандиамина (в 15 раз) и гептандиамина (в 64 раза). Высокая селективность СВ[6] была использована для разработки молекулярных переключателей.

Также важен и размер гостевых молекул. СВ[6] также проявляет селективные свойства относительно размера молекул: формирует стабильные комплексы с циклическими соединениями $(\text{CH}_2)_3\text{CHCH}_2\text{NH}_2$ и $(\text{CH}_2)_4\text{CHCH}_2\text{NH}_2$, в то время как их 3х и 6-тичленные аналоги с СВ[6] не связываются.

Кроме того, СВ[6] селективен в отношении форм гостевых молекул. Так, $(\text{CH}_2)_4\text{CHCH}_2\text{NH}_2$ и производное бензола 4- $\text{MeC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}_2$ (пара - изомер) имеют схожие размеры (86 и 89 Å), но циклическое соединение связывается в 1000 раз сильнее. Однако, орто- и мета - изомеры данного производного бензола вообще не связываются с СВ[6].

Наконец, СВ[6] показывает селективность относительно функциональных групп - $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ образует в 6 раз более прочную связь чем $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, который связывается в 79 раз прочнее чем

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, поскольку кислород обладает большей гидрофильностью, чем сера, а метильная группа наиболее гидрофобна.

Следовательно, СВ[n] в качестве «гостя» лучше всего подходит молекула или часть молекулы, соответствующая размеру полости, несущая на себе положительный заряд, чтобы связаться с кавитандом в области портала, но при этом имеющая гидрофобную часть, лучше циклическую, чтобы осуществлять взаимодействие с гидрофобной полостью. Потенциальными кандидатами для образования комплексов «гость-хозяин» в таком случае являются циклические гидрофобные аминокислоты и положительно заряженные аминокислоты, а также пептиды и белки, имеющие в своем составе аминокислотные остатки из данных аминокислот.

1.2.2 Комплексы кукурбитурилов по типу «гость-хозяин» с различными лекарственными средствами.

Потенциальные кандидаты, имеющие возможность применения в качестве носителя для транспортировки и защиты от биodeградации лекарственных средств должны обладать низкой токсичностью. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что СВ[n] с и их производные являются инертными и нетоксичными. При концентрации до 1 мМ СВ[7] не проявляет цитотоксическую активность по отношению к различным клеточным линиям человека и животных (Jeon *et al.*, 2005; Hettiarachchi *et al.*, 2010). При введении *in vivo* СВ[7] показано, что максимально переносимая доза составляет 250 мг/кг; внутривенное введение СВ[n] ограничено из-за низкой растворимости, а не из-за развития побочных эффектов. При пероральном введении смеси СВ[6] -СВ[8] максимально переносимая доза была увеличена до 600мг/кг (Uzunova *et al.*, 2010) СВ[n] в опытах *in vivo* не показывают никаких признаков острой системной токсичности. При применении СВ[7] в очень высоких дозах возможны проявления миотоксичности и нейротоксичности, однако в стандартных концентрациях, используемых при

комплексообразовании с лекарственными препаратами, признаков токсичности нет (Chen *et al.*, 2015; Oun *et al.*, 2014).

Экспериментально доказано, что комплексы СВ [7] и СВ [8] типа «гость-хозяин» с гостевой молекулой-красителем могут пересекать клеточную мембрану (Montes-Navajas *et al.*, 2009). Существует высокая степень вероятности, что другие СВ[n] комплексы типа «гость-хозяин» будут аналогично проявлять себя при прохождении через клеточную мембрану, и, следовательно, могут быть эффективными носителями для транспорта лекарственных препаратов.

Образование комплексов СВ[n] с лекарственными средствами предлагается применять для достижения следующих преимуществ (McInnes *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2015; Saleh *et al.*, 2008; Zhang and Isaacs, 2014):

- Увеличение стабильности лекарственного средства и снижение коэффициента деградации *in vivo*
- Увеличение растворимости
- Контроль клиренса
- Изменение способа приема (с парентерального на пероральный)
- Маскировка вкуса

В настоящее время получены комплексы СВ[n] с парацетамолом и мемантином (McInnes *et al.*, 2010), цисплатином (Wheate *et al.*, 2006), прилокаином (Wyman *et al.*, 2010), кумарином (Wang *et al.*, 2009), изониазидом (Wheate *et al.*, 2010), сангвинарином (Miskolczy *et al.*, 2011) берберином (Miskolczy and Biczók, 2014), пилокарпином (Saleh *et al.*, 2014) и другими лекарственными средствами.

Эффект увеличения растворимости получен при комплексообразовании с СВ[8] различных соединений платины (McInnes *et al.*, 2010), также наблюдалось повышение растворимости альбендазола при комплексообразовании с СВ[6], СВ[7] и СВ[8], при котором значение

возросло с 3 мкМ до 2-7 мМ, в зависимости от используемого СВ[n] (Zhao *et al.*, 2008).

Влияние комплексообразования с СВ[n] на биологические свойства лекарственных препаратов на сегодня изучено мало, но имеет большие перспективы, поэтому представляет значительный интерес в настоящее время. Наиболее исследованы на сегодняшний день свойства комплексов СВ[n] с противоопухолевыми препаратами, основанными на соединениях ионов металлов, в первую очередь платины (II) (Damian *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2013). Исследования *in vivo* показали, что СВ[n] снижают токсический побочный эффект препарата (Wheate, 2008). Комплексы СВ[n] *in vitro* с [Pt(5-хлоро-1,10-фенантролин)((1S,2S)-диаминоциклогексан)]²⁺ (5CLSS) проявляли различные свойства: СВ[7] и СВ[8] снижали цитотоксичность, а СВ[6] увеличивал ее в 2,5 раза (Kemp *et al.*, 2007). Аналогичным образом производные бензимидазола образуют комплексы «гость-хозяин» с СВ[6], СВ[7] и СВ[8] с увеличением растворимости с 8 мкМ для свободной формы до 2-9 мМ для комплекса.

1.2.3. Возможность образования комплексов «гость-хозяин» СВ[n] с различными лекарствами на основе пептидов.

В настоящее время пептиды в качестве лекарств находят применение в различных областях медицины, таких как неврология, эндокринология, гематология и иммунология (Shaji and Patole, 2008). Поскольку пептиды быстро расщепляются энзимами ЖКТ, обычно применяются внутривенный или подкожный способы введения таких лекарств. Разработка методик, позволяющих пероральный прием лекарственных пептидов, является на сегодняшний день перспективным направлением, поскольку такой способ доставки обладает явными преимуществами по сравнению с инвазивными методами и расширяет спектр применения препарата.

CB[n] не способен включать в свою полость весь пептид, защищая таким образом от действия пептидаз, однако может связываться с боковыми радикалами аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Кандидатами для образования комплексов типа «гость-хозяин» из аминокислот в данном случае могут подходить гидрофобные ароматические аминокислоты, такие как фенилаланин, тирозин, триптофан. Показано образование комплексов триптофана и тирозина с CB[7] и CB[8] в пропорции 1:1, фенилаланина с CB[7] в соотношении 1:1, а с CB[8] 2:1 (Zhang H., 2006).

В области порталов CB[n] могут связываться с аминокислотами, у которых боковые радикалы положительно заряжены – известно образование комплексов данного типа с аргинином и лизином (Hennig et al., 2007). Кроме того, CB[7] может образовывать комплексы с другими аминокислотами и их производными (Jang et al., 2014; Kovalenko and Mainichev, 2015; Lee et al., 2015; Yi et al., 2009).

Связывание аминокислот в пептидную цепь может снижать возможность ассоциации боковых радикалов с CB[n] в случае ароматических аминокислотных остатков. Так, при исследовании комплексообразования «гость-хозяин» с трипептидами, содержащими ароматические аминокислоты в одном из трех возможных положений, CB[8] связывался только с Trp-Gly-Gly и Phe-Gly-Gly, что говорит о селективности по положению (Heitmann et al., 2006; Smith et al., 2015).

Пептидные лекарства могут состоять не только из L –аминокислот, как большинство природных белков и пептидов, но и из D- аминокислот (Sela and Zisman, 1997). Включение D- аминокислоты в лекарственный пептид может быть обусловлено получением аналогов лекарственного средства, снижением деградации пептида под действием ферментов, уменьшением иммуногенности. Вследствие изложенных фактов возможные различия между комплексообразованием CB[n] с пептидами, содержащими и не содержащими D-аминокислоты, может иметь практическое значение.

В сущности не обладая хиральностью, СВ[n], проявляют стереоселективные свойства при комплексообразовании «гость-хозяин» (Rekharsky *et al.*, 2006). Стереоселективность была проверена по отношению к фенилаланин – содержащим дипептидам. Данное свойство может иметь практическое применение для разделения смеси стереоизомеров пептидных препаратов.

Исследование свойств комплексов СВ[7] с пептидами выявило высоко специфичное ингибиторное действие на различные протеазы (Hennig *et al.*, 2007). В данной работе рассматривалось действие химотрипсина, трипсина и лейцинаминопептидазы на группу пептидов в присутствии и при отсутствии СВ[7]. Наблюдалось ингибирование трипсина (разрушающего пептидные связи после аргинина и лизина) по отношению одним пептидам и ЛАП (лейцинаминопептидазы, отщепляющей любые N-концевые аминокислоты) - по отношению к другим. Была замечена высокая аффинность для положительно заряженных аминокислотных остатков (аргинин, лизин). Следовательно, СВ[7] могут препятствовать гидролизу субстратов (и потенциальных лекарств) трипсином, ЛАП и другими ферментами, распознающими положительно заряженные аминокислотные остатки. Наблюдаемое воздействие СВ[7] на активность протеаз имеет важное значение для возможного применения в фармакологии, в первую очередь для защиты пептидных и белковых препаратов от биодegradации. Таким образом, использование СВ[7] в качестве защиты от действия ферментов для пептидов и белковых молекул, содержащих положительно заряженные аминокислотные остатки, является перспективным для получения новых лекарственных форм.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Используемые реактивы:

Кукурбит[7]урил (синтезирован в Институте неорганической химии им. А.В. Николаева, СО РАН, Новосибирск), тафтсин («НПФ ВЕРТА», Санкт-Петербург), дапоксил («Invitrogen», США), фиколл («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), урографин («Schering AG», Германия), культуральная среда RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), L-глутамин (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), меркаптоэтанол («Sigma-Aldrich», США), HEPES буфер («Sigma-Aldrich», США), гентамицина («KRKA», Словения), инактивированная сыворотка FCS («HyClone», США), конканавалин А («CALBIOCHEM», Германия), фосфатно-солевой буфер (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), зимозан (Олайнский завод биопрепаратов), НСТ («Диаэм», Москва), диметилсульфоксид («Panreac», Испания), додецилсульфат натрия («Медиген», Новосибирск), 3Н-тимидин («Радиевый институт им. В.Г. Хлопина», Санкт-Петербург), комплемент (ЗАО «ЭКОЛаб», Москва).

2.2. Конкурентное флуоресцентное титрование

В качестве метода оценки константы комплексообразования (K_a) СВ[7] с пептидом тафтсином был выбран метод конкурентного флуоресцентного титрования как наиболее доступный и легкий в интерпретации по сравнению с другими методиками определения K_a , в частности, ЯМР. Конкурентное флуоресцентное титрование проводилось на флуориметре Varian Eclipse spectrofluorimeter (США) при температуре 25°C с использованием кварцевой кюветы объемом 100 мкл. Исследования проводились в 10мМ ацетатном буфере при pH 6.0.

Метод основан на использовании свойств комплекса кукурбит[7]урилла и флуоресцентного красителя дапоксила (Diwu *et al.*, 2000; Koneg *et al.*, 2007; Nau *et al.*, 2009; Tomin *et al.*, 2006). При комплексообразовании с кукурбит[7]урилом спектр флуоресценции дапоксила изменяется, что позволяет различить в растворе свободный краситель и его комплекс. Поэтому первым этапом работы было получение комплекса СВ[7] с дапоксилом и подбор концентраций исходных веществ для проведения конкурентного флуоресцентного титрования. Вторым этапом работы было собственно конкурентное флуоресцентное титрование тафтсином комплекса СВ[7] с дапоксилом. При вытеснении дапоксила из полости СВ[7] конкурирующим веществом (в данном случае тафтсином) происходит обратное смещение спектра до характерного для свободного дапоксила.

В кювете готовили раствор соответствующего соединения в буфере с точно известной концентрацией путем разбавления более концентрированного раствора и затем записывали спектр поглощения/флуоресценции. В полученный раствор далее небольшими порциями (5 – 20 мкл) прибавлялся раствор тафтсина в том же растворителе (также с известной концентрацией). Разбавление исходных растворов учитывалось (табл. 1).

После каждой добавки раствора записывался спектр поглощения/флуоресценции. Титрование считалось оконченным тогда, когда спектр переставал меняться при добавлении очередной порции титранта. В присутствии тафтсина в определенной концентрации в растворе устанавливается равновесие между свободной и комплексированной формами веществ, характеризуемое константой K_a . В равновесном состоянии флуоресценция раствора (а также результирующее поглощение) определяются равновесными концентрациями участвующих в комплексообразовании частиц. Зная исходные концентрации веществ, K_a СВ[7] с дапоксилом и интенсивность флуоресценции, можно рассчитать

равновесные концентрации и K_a СВ[7] с тафтсином. Расчеты проводили с помощью компьютерной программы Origin 7.0.

Таблица 1.

Концентрации веществ в растворе при проведении конкурентного флуоресцентного титрования.

$C_{\text{Дарохл}}$	$C_{\text{СВ[7]}}$	C_{tuftsin}
$2,50 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-5}$	0
$2,48 \times 10^{-6}$	0,00001	9,937888
$2,47 \times 10^{-6}$	$9,94 \times 10^{-6}$	19,75309
$2,44 \times 10^{-6}$	$9,82 \times 10^{-6}$	39,02439
$2,48 \times 10^{-6}$	0,00001	99,38958
$2,47 \times 10^{-6}$	$9,94 \times 10^{-6}$	159,0318
$2,44 \times 10^{-6}$	$9,82 \times 10^{-6}$	276,1862
$2,42 \times 10^{-6}$	$9,72 \times 10^{-6}$	367,9203
$2,38 \times 10^{-6}$	$9,58 \times 10^{-6}$	502,3214
$2,35 \times 10^{-6}$	$9,47 \times 10^{-6}$	611,4901
$2,33 \times 10^{-6}$	$9,3610^{-6}$	718,1777
$2,27 \times 10^{-6}$	$9,15 \times 10^{-6}$	924,4404
$2,22 \times 10^{-6}$	$8,94 \times 10^{-6}$	1121,735
$2,17 \times 10^{-6}$	$8,75 \times 10^{-6}$	1310,634
$2,13 \times 10^{-6}$	$8,56 \times 10^{-6}$	1491,663

2.3. Выделение МНК ПК из периферической крови человека.

Для исследований использовали гепаринизированную венозную кровь (50 Ед на 1 мл крови) условно здоровых доноров. МНК выделяли стандартно, путем центрифугирования венозной крови в градиенте плотности фиколлюрографина ($\rho=1,082$ г/л) (Вöyum, 1968). Кровь разбавляли культуральной средой RPMI-1640 в соотношении 1:1. Далее 5 мл крови наслаивались на 3 мл раствора фиколлюрографина и центрифугировали при 3000 оборотов/мин в течение 20 мин. МНК ПК, собранные из интерфазы, отмывали средой RPMI-1640 с 1% FCS 3 раза путем ресуспендирования и последующего центрифугирования при 1500 оборотов/мин в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 0,3% L-глутамин, 5×10^{-4} М меркаптоэтанол, 5 мМ HEPES буфера, 80 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки FBS.

2.4. Культивирование МНК ПК in vitro.

Культивирование МНК ПК проводили в 24-луночных плоскодонных планшетах («Costar», США) в концентрации 1 млн/мл. В каждую лунку помещался 1 мл полной культуральной среды - RPMI-1640, содержащей 0,3% L-глутамин, 5мМ HEPES- буфера, 4% гентамицина и 10% инактивированной сыворотки FBS. Для стимуляции клеток использовали конканавалин А в концентрации 10 мкг/мл. Время культивирования составляло 24, 48 либо 96 часов, в зависимости от задачи. Клетки культивировались во влажной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С. Для сбора кондиционной среды клетки осаждали центрифугированием при 1500 оборотов/мин в течение 10 мин.

Культивирование МНК ПК проводили в присутствии комплекса кукурбит[7]урилы с тетрапептидом тафтсином (1 мкг/мл тафтсина в 0,5 мМ СВ[7]). В качестве контроля использовались интактные МНК ПК, а также МНК ПК, культивированные в присутствии 1мкг/мл тафтсина, МНК ПК,

культивированные в присутствии 0,5мМ кукурбит[7]урила и также клетки, активированные конканавалином А (КонА).

2.5. Оценка пролиферативной активности клеток.

Клетки культивировали в объеме 150 мкл в круглодонных 96-луночных планшетах («Costar», США) в конечной концентрации $0,1 \times 10^6$ клеток на лунку (МНК ПК) Для стимуляции пролиферативного ответа МНК ПК использовали Кон А.

Пролиферацию клеток оценивали по уровню включения ^3H -тимидина в ДНК мононуклеаров после 6-часовой инкубации. Через 96 ч культивирования во влажной атмосфере с 5 % CO_2 при 37 °С вносили по 1 мкКи (37 кБк) ^3H -тимидина. Через 6 ч (соответственно через 112 ч от начала культивирования) клетки осаждали на мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Уровень радиоактивности в кислотонерастворимой фракции оценивали на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Результаты представляли в виде среднего счета (импульс/мин) из трех идентичных культур.

2.6. Оценка показателей клеточного цикла.

Показатели клеточного цикла оценивали после 48 часов инкубации у интактных клеток и клеток, культивированных в присутствии 0,5 мМ кукурбит[7]урила. После культивирования мононуклеары двукратно отмывали от среды раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Ресуспендированный осадок фиксировали путем добавления 1 мл 1% раствора параформальдегида в ФСБ с последующим инкубированием в течение 15 минут при 20°С. После чего клетки центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли. Для проведения пермеабиллизации к ресуспендированному остатку добавляли 1 мл 0,02% Твин-20 и инкубировании в течение 10 минут при 20°С. Клетки

центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли. Затем осадок отмывали ФСБ-ЭДТА. К клеткам добавляли ФСБ-ЭДТА, содержащий ДНК-интеркалирующий краситель 7-AAD в конечной концентрации 20 мкг/мл.

Уровень апоптоза анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (Becton Dickinson). Лимфоцитарную и моноцитарную область выделяли по параметрам FSC и SSC. Затем методом последовательного гейтирования строили одномерную гистограмму по каналу флуоресценции FL3-A, на которой апоптотичные клетки определяли как клетки с гиподиплоидным набором ДНК. Результат выражали в виде процентного соотношения позитивных клеток к общему количеству клеток (Fruehauf *et al.*, 1998).

2.7. Определение продукции цитокинов МНК ПК иммуноферментным методом.

Продукцию фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) и интерлейкина-2 (ИЛ-2) оценивали в супернатантах 24-часовых культур МНК ПК, интерферона γ (ИНФ- γ) и интерлейкина - 4 (ИЛ-4) – в 48-часовых супернатантах. После инкубации клетки осаждали центрифугированием, собирали супернатанты и сохраняли при -20° С до момента тестирования. Концентрацию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест- системы производства «Вектор-Бест», Новосибирск в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Оптическую плотность окрашенных растворов в лунках измеряли при помощи спектрофотометра с вертикальным прохождением света Anthos 2020 («Anthos Labtec», Австрия) при длине волны 450 нм.

2.8. Характеристика и условия содержания лабораторных животных.

В работе были использованы мыши-самцы гибриды F1 (СВА×С57В1/6) в возрасте 2 мес, полученные из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (Кополадзе, 1998).

В экспериментах *in vivo* для внутрибрюшинного введения использовались растворы кукурбит[7]урилы и тафтсина в фосфатно-солевом буфере. Животные были разделены на группы по 8-10 мышей, которым внутрибрюшинно трехкратно в течение недели проводили инъекции: первой группе – комплекс тафтсина с кукурбит[7]урилом (25 мкг тафтсина в 0,25 мл 4М раствора кукурбит[7]урилы), второй – 25 мкг тафтсина в 0,25 мл буфера, третьей – 0,25 мл 4М раствора кукурбит[7]урилы, четвертой – 0,25 мл фосфатно-солевого буфера.

2.9. Получение перитонеальных макрофагов и нейтрофилов.

Резидентные перитонеальные макрофаги, получаемые для оценки клеточности после инъекций препаратами и исследования продукции супероксидного радикала *in vivo*, выделяли вымыванием питательной средой из полости умерщвленных декапитацией животных без предварительного введения какого-либо дополнительного препарата для привлечения в брюшную полость элиситированных макрофагов. Мыши обезглавливались непосредственно перед выделением макрофагов, затем тушка смачивалась 70% раствором этилового спирта, после чего в брюшную полость вводили 10 мл среды RPMI-1640, охлажденной до температуры тающего льда. После двухминутного массажа брюшной полости производили отсос перитонеальной жидкости в стерильные центрифужные пробирки. Полученные клетки отмывали средой RPMI-1640 2 раза путем

ресуспендирования и последующего центрифугирования при 1000 оборотов/мин в течение 10 минут. Осадок тщательно ресуспендировали, концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли по включению трипанового синего. Полученная таким образом суспензия содержала 86-96% макрофагов, тестированных по способности к прилипанию, морфологии, фагоцитозу эритроцитов барана. Культивирование проводили в течение часа в 24-луночных планшетах в концентрации 2×10^6 клеток на лунку с использованием культуральной среды RPMI-1640, содержащей 10 % сыворотки эмбрионов коров и 0,3 % L-глутамина.

Для получения перитонеальных элиситированных нейтрофилов и макрофагов для дальнейшего их исследования внутрибрюшинно вводили 1 мл 10%-го стерильного пептона. Через 3 ч мышь умерщвляли декапитацией и из брюшной полости 10 мл холодной среды RPMI-1640 вымывали перитонеальные нейтрофилы способом, описанным выше, аналогичным образом через 96 ч после введения пептона выделяли перитонеальные макрофаги. Полученные клетки отмывали средой RPMI-1640 2 раза путем ресуспендирования и последующего центрифугирования при 1000 оборотов/мин в течение 10 минут. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (5 % CO₂, 37 °C) в 24-луночных либо 96-луночных планшетах («Costar», США) в среде RPMI-1640, содержащей 0,3 % L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 4 % гентамицина и 10 % инактивированной сыворотки крови эмбрионов коров FCS в концентрации 2 млн/мл в течение 1 ч (нейтрофилы) либо 1 млн/мл в течение 4 или 48 ч (макрофаги). Культивирование проводили в присутствии комплекса кукурбит[7]урилы с тафтсином (0,5 мМ кукурбит[7]урилы и 1 мкг/мл тафтсина), в качестве контроля использовались клетки, культивированные со свободными кукурбит[7]урилом и тафтсином в тех же концентрациях, а также интактные клетки.

2.10. Оценка продукции супероксидного радикала перитонеальными нейтрофилами и макрофагами мыши.

Оценка продукция супероксидного радикала проводилась модифицированным нами спектрофотометрическим методом определения восстановления р-нитросинего тетразолия (НСТ) до формазана (Любимов и др., 1992; Amano et al., 1975). Клетки дважды промывали бесцветным раствором фосфатно-солевого буфера с 0,1% содержанием глюкозы. К отмытому монослою клеток добавляли 0,5 мл раствора фосфатно-солевого буфера с 0,1% содержанием глюкозы с добавлением 2мг/мл зимозана, предварительно опсонизированного сывороткой мышей, и 1 мг/мл НСТ. Планшет с пробами термостатировали при 37°C в течение 30 минут. Реакцию останавливали добавлением в лунки 50 мкл 5N HCl, надосадочную жидкость декантировали и гранулы формазана растворяли в 0,5 мл диметилсульфоксида. Оптическую плотность измеряли на мультимодальном планшетном ридере («Berthold Technologies», США) при длине волны 540 нм. Результаты выражали в условных единицах оптической плотности.

2.11. Оценка Fc-рецептор-опосредованного фагоцитоза.

Тест проводился в 48-луночных планшетах («Costar», США). В каждую лунку заливалось по 0,5 мл среды с концентрацией перитонеальных макрофагов 2 млн/мл. после 4 либо 48 часовой преинкубации в условиях 37°C, во влажной камере с концентрацией углекислого газа 5% образовавшийся монослой прилипших клеток дважды отмывали от неприлипающей фракции клеток 2 мл теплого раствора PBS с глюкозой (0,1%)

Эритроциты барана трижды отмывались в растворе PBS с глюкозой (0,1%) при 3000 оборотов/мин, а затем в таком же растворе готовилась 5% их суспензия. В кроличьей гемолитической сыворотке определялось субагглютинирующее разведение, в котором в дальнейшем проводилась

опсонизация эритроцитов при 37°C в течение 30 минут. Опсонизированные таким образом эритроциты дважды отмывались в растворе PBS с 0,1 % глюкозой, и после последнего осаждения эритроцитарный осадок ресуспендировали в растворе PBS с 0,1% глюкозой до 1% суспензии. Полученная суспензия эритроцитарных конъюгатов хранилась при 4°C до использования.

Оценка Fc-рецептор-опосредованного фагоцитоза проводилась спектрофотометрически. К монослою макрофагов добавляли по 1 мл 1% суспензии опсонизированных эритроцитов барана, после чего пробы термостатировали при 37°C в течение 30 минут. По истечении этого срока суспензия эритроцитов быстро декантировалась, и лунки заполнялись 1 мл 0,09% гипотоническим раствором NaCl (для проведения гипотонического шока нефагоцитированных эритроцитов). Гемолизат удаляли, а лунки 3 раза отмывали бесцветным теплым физиологическим раствором (по 2 мл на каждую заливку). Тщательно удалив физиологический раствор, оставшийся после последней отмывки, лунки заполняли 250 мкл 1% раствора детергента (додецилсульфат натрия). Солюбилизат пипетировали и по 100 мкл аликвоты (2 раза с одной лунки) закапывали в 96-луночный планшет для фотометрического сканирования на мультимодальном планшетном ридере («Berthold Technologies», США) при длине волны 405 нм. Результат выражали в условных единицах оптической плотности.

2.12. Оценка показателей иммунной системы in vivo (АОК, ГЗТ)

Для оценки параметров иммунной системы in vivo мышей иммунизировали тимус-зависимым антигеном – 3% раствором эритроцитов барана (ЭБ) внутрибрюшинно в объеме 500 мкл среды RPMI-1640, иммунизация проводилась на следующий день после второго введения комплекса СВ[7] с тафтсином и за 2 дня до третьего введения. Результаты оценивались на восьмые сутки после первого введения препарата.

Определялось количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у лабораторных животных.

Гуморальный иммунный ответ оценивали на пике ответа – на четвертые сутки (IgM-АОК) по количеству зон гемолиза в жидкой среде (Cunningham, 1965). У мышей после забоя дислокацией шейных позвонков изымались селезенки, из которых готовилась клеточная суспензия в среде RPMI-1640. Далее готовили инкубационную смесь: 500 мкл клеточной суспензии, 500 мкл комплемента (ЗАО «ЭКОЛаб», Россия) и 500 мкл суспензии ЭБ (12×10^8 ЭБ/мл). Компоненты перемешивали, смесь заливали в стеклянные камеры, сделанные из двух предметных стекол, склеенных между собой вдоль продольных сторон при помощи смеси воска с парафином. При заполнении смесью учитывали объем камеры. Камеры помещали в термостат и инкубировали при 37°C в течение 90 минут, после чего подсчитывали зоны гемолиза под бинокулярной лупой по формуле: Абсолют. АОК = $(A \times B \times C) / D$, где А - количество АОК на камеру, В – объем клеточной суспензии, С – разведение клеточной суспензии, D – объем камеры.

Клеточный иммунитет оценивали по степени выраженности реакции ГЗТ – по величине отека лапы после введения разрешающей дозы ЭБ предварительно сенсibilизированным животным. На четвертые сутки после иммунизации антигеном вводили разрешающую дозу в виде 50% суспензии ЭБ в RPMI-1640 в объеме 50 мкл под подошвенный апоневроз правой задней лапы. В левую заднюю лапу для контроля вводили среду в том же объеме. Учет реакции проводился через 24 часа во величине местного отека. Объем отека оценивался при помощи штангенциркуля. Результат выражали в относительных (отношение разности между отеком лапки после введения ЭБ и отеком лапки после введения среды к отеку левой лапки) единицах.

2.13. Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя медиану (Me), 25-ю и 75-ю процентиль (LQ, HQ), и представляли в виде Me (LQ, HQ). Оценку различий между клетками, культивированными в различных условиях, проводили при помощи непараметрического критерия Вилкоксона, а различия между группами животных оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Исследование комплексообразования СВ[7] с тафтсином.

Основной характеристикой, определяющей возможность образования комплекса и его стойкость, является константа комплексообразования K_a . В качестве метода для определения константы комплексообразования СВ[7] с тафтсином было предложено использовать метод конкурентного флуоресцентного титрования. В ходе эксперимента детектировался флуоресцентный отклик при введении в систему конкурентного нефлуоресцирующего субстрата-«гостя», пептида тафтсина. В данном случае тафтсин вытеснял из полости СВ[7] краситель дапоксил, интенсивность флуоресценции которого меняется в зависимости от того, образует ли он комплекс с СВ[7] (рис. 1). Поэтому сначала необходимо было исследовать в наших условиях комплексообразование СВ[7] с дапоксилом и подобрать условия для дальнейшего конкурентного титрования.

На первом этапе провели титрование дапоксила СВ[7] для определения константы комплексообразования СВ[7] с дапоксилом в наших условиях - в 10мМ ацетатном буфере при рН 6.0 при температуре 25°C. Полученное значение $K_a = (1.8 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, практически совпадало с литературными данными ($K_a = 2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Koner and Nau, 2007). Кроме того, были подобраны оптимальные уровень напряжения (700V) и длины волн ($\lambda_{\text{exc}} = 320\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 380\text{nm}$) для последующего конкурентного титрования. Для конкурентного флуоресцентного титрования также было необходимо определить исходные концентрации дапоксила и СВ[7] таким образом, чтобы раствор не был насыщен до предела «молекулами- гостями» и оставалась возможность вытеснения таких молекул из полости «хозяина» конкурирующим веществом – пептидом. В ходе анализа полученных на первом этапе результатов были подобраны следующие исходные

концентрации веществ для следующего этапа: дапоксила – 2.5 μM , СВ[7] – 10 μM .

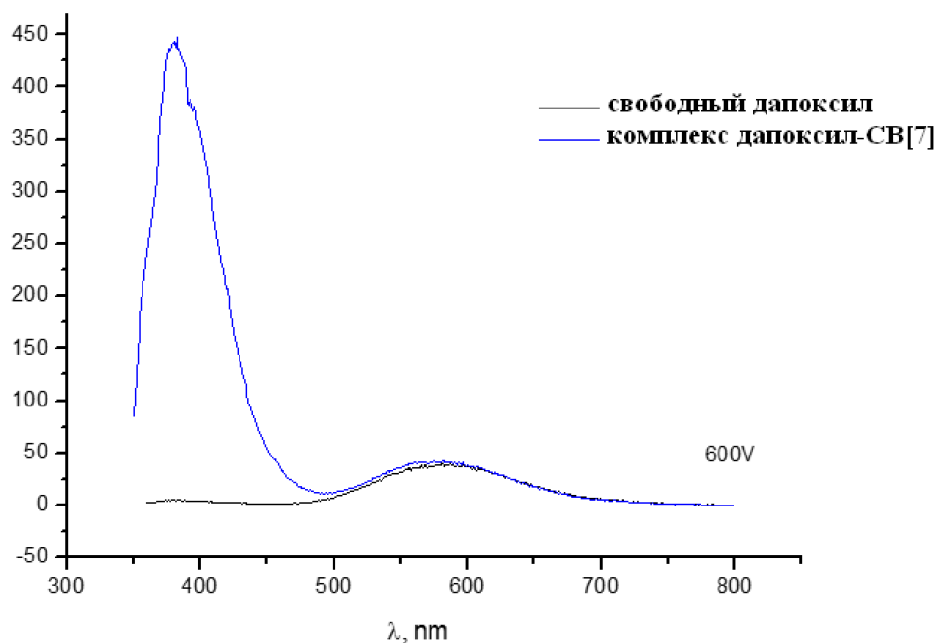


Рис. 1. Спектры флуоресценции свободного дапоксила (10 μM) и его комплекса с СВ[7] (50 μM), ($U=600\text{ V}$, $\lambda_{\text{exc}} = 336\text{ nm}$).

Конкурентное флуоресцентное титрование проводилось путем постепенного добавления определенных количеств конкурирующего вещества (пептида) к буферному раствору, содержащему СВ[7] и краситель. Интенсивность флуоресценции исходного раствора на определяемой нами длине волны при добавлении пептида снижалась вследствие вытеснения красителя из полости СВ[7] (рис. 2).

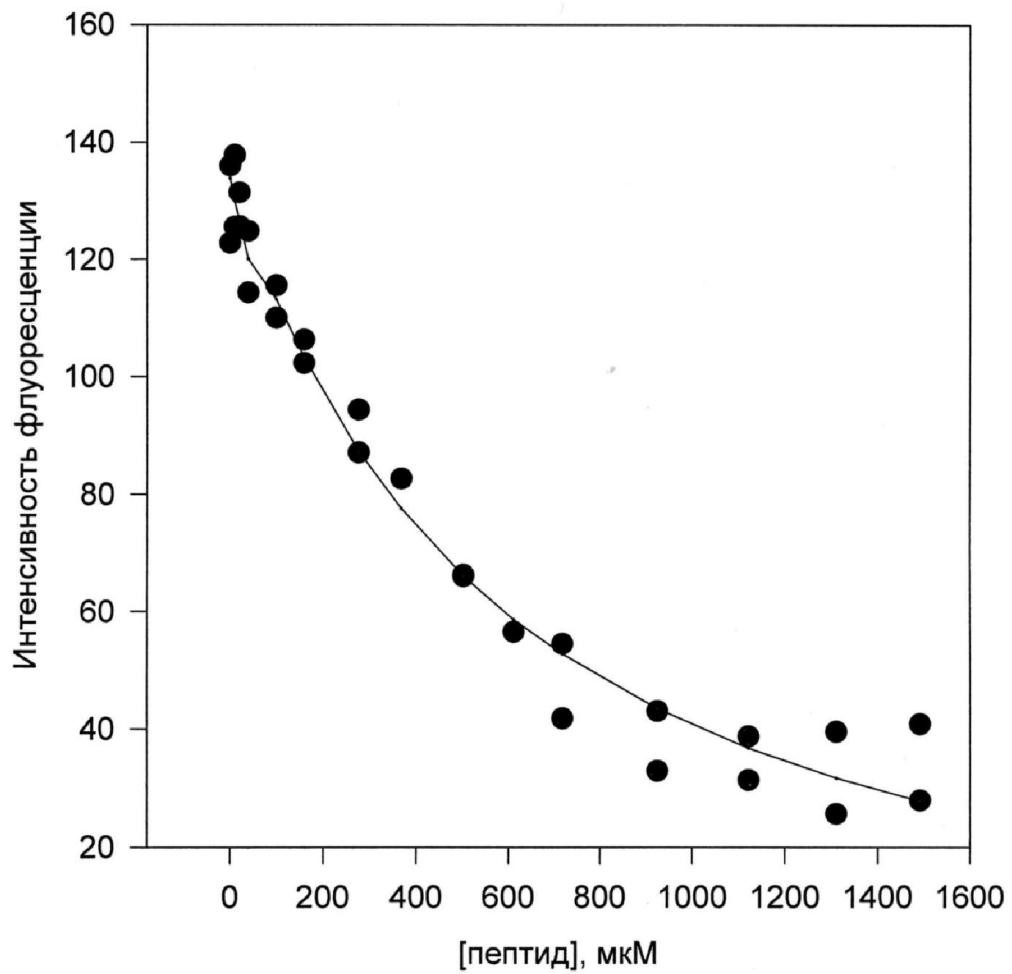


Рис. 2. Кривая конкурентного флуоресцентного титрования, демонстрирующая снижение флуоресценции красителя, вытесненного из полости кавитанда при помощи пептида.

Исходя из концентрации исходных веществ и зависимости интенсивности флуоресценции от количества добавляемого тафтсина были проведены расчеты константы. В результате константа комплексообразования СВ[7] с пептидом тафтсином, характеризующая стабильность комплекса, составила $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Поскольку комплексообразование происходит за счет положительно заряженных аминокислотных групп, константа может изменяться в зависимости от рН раствора. Тафтсин имеет изоэлектрическую точку $pI=11,64$, которая находится в щелочной среде. Соответственно, при нейтральных и слабощелочных значениях рН пептид будет заряжен положительно. Более того, стабильный положительный заряд пептида, равный 2, будет сохраняться в широком диапазоне значений рН - от 3 до 9. Следовательно, в этом диапазоне аминокислотные остатки аргинина и лизина будут сохранять протонирование, а значит будут способны на связывание с карбонильными группами в области порталов кавитанда при образовании комплекса «гость-хозяин». Таким образом, при широком спектре значений рН от 3 до 9 раствора, в котором находится комплекс, константа комплексообразования будет сохраняться на том же уровне, что позволяет комплексу оставаться стабильным в различных физиологических средах организма, обладающих различным уровнем рН.

Исходя из константы комплексообразования, растворимости и литературных данных по исследованию биологической активности составляющих комплекса для экспериментов *in vitro* были подобраны оптимальные концентрации исходных веществ – 0,5 мМ СВ[7] и 1 мкг/мл тафтсина, после чего можно было приступить к исследованию иммунологических свойств комплекса *in vitro*.

3.2. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на пролиферацию МНК ПК.

Влияние комплекса на функциональные свойства лимфоцитов оценивалось нами по спонтанной и КонА-индуцированной пролиферативной активности МНК ПК. Было показано, что комплекс тафтсина с СВ[7] не влияет на пролиферативную активность МНК ПК условно здоровых доноров при спонтанной пролиферации. В случае стимулирования пролиферации митогеном КонА при добавлении комплекса наблюдается схожая ситуация – добавление в культуру комплекса тафтсина с СВ[7] не приводит к изменению пролиферативной активности стимулированных митогеном клеток. Свободные пептид и СВ[7] также не влияют на пролиферацию мононуклеаров как в случае спонтанной пролиферативной активности, так и при стимулировании пролиферативной активности митогеном (табл. 2).

Таким образом, в используемых дозах ни комплекс тафтсина с СВ[7], ни свободный пептид, ни кавитанд по отдельности не влияют на пролиферацию МНК ПК как в случае спонтанной, так и в случае митоген-индуцированной пролиферативной активности.

Таблица 2.

Влияние комплекса СВ[7] с тафтсином, а также свободных тафтсина и СВ[7] на пролиферативный ответ МНК ПК.

Условия инкубации	Скорость включения НЗ-тимидина в ДНК, имп./мин на лунку	
	Спонтанная пролиферация, n=12	КонА-стимулированная пролиферация, n=16
контроль	163 (105-387)	6243 (3648-16427)
СВ[7]	244 (167-397)	5369 (3404-15359)
Тафтсин	253 (118-371)	5568 (3275-14765)
Комплекс	240 (108-334)	7478 (3794-14339)

Примечание: n – число доноров. Данные оценены с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей)

Также с целью оценки влияния макроциклического кавитанда СВ[7] на функциональную активность МНК ПК были исследованы показатели фаз клеточного цикла и спонтанного апоптоза. Данные показатели были практически идентичны в контроле и у клеток, культивированных в присутствии СВ[7] (Табл. 3). Следовательно, присутствие СВ[7] в исследуемой дозе не подавляет клеточную пролиферацию и не индуцирует апоптоз МНК ПК.

Таблица 3.

Относительное количество мононуклеаров в разных фазах клеточного цикла, %.

	СВ[7], 0,5 мМ	Контроль
G1/G0	91,69 (88,26-93,55)	91,69 (88,72-92,41)
SМ	8,59 (6,64-11,93)	8,59 (7,8-11,45)
Апоптоз	0,14 (0,08-0,2)	0,12 (0,06-0,15)

Примечание: Данные оценены с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей)

Исходя из вышеизложенного, присутствие СВ[7] в исследуемой дозе не подавляет клеточную пролиферацию МНК ПК. Тафтсин, как и комплекс пептида с СВ[7], также не влияет на пролиферацию. Для более полной оценки влияния комплекса и его компонентов на функциональную активность МНК ПК была поставлена задача изучить воздействие комплекса на цитокинпродуцирующую способность клеток, что и явилось следующим этапом нашей работы.

3.3. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на цитокинпродуцирующую способность МНК ПК.

Для изучения способности МНК ПК к продукции иммунорегуляторных цитокинов *in vitro* исследовалась спонтанная и КонА-индуцированная способность МНК ПК, культивированных в присутствии комплекса СВ[7] с тафтсином, в присутствии свободных СВ[7] либо тафтсина, а также интактных клеток, продуцировать различные цитокины: провоспалительные медиаторы ФНО α и ИНФ γ , Th1-стимулирующий ИЛ-2 и ИЛ-10, обладающий противовоспалительным и Th2-стимулирующим действием.

Было выявлено, что свободный пептид активировал спонтанную продукцию только ФНО α , однако концентрация ИНФ- γ также имела тенденцию к повышению по сравнению с контролем, но различия были не достоверны (табл. 4). СВ[7] повышал продукцию ИНФ- γ по сравнению с контролем. Таким образом, СВ[7], изначально предполагаемый нами как биоинертная молекула, используемая только для защиты от пептидаз, сам обладает определенным иммуностимулирующим действием. Добавление комплекса тафтсина с СВ[7] обуславливало повышение уровня всех исследуемых цитокинов (ФНО- α , ИНФ- γ , ИЛ-2 и ИЛ-10) по сравнению с контролем - нестимулированными МНК ПК.

Таблица 4.

Влияние комплекса тафтсина с СВ[7], а также свободных тафтсина и СВ[7] на спонтанную продукцию цитокинов МНК ПК.

	ФНО α	ИНФ γ	ИЛ-2	ИЛ-10
контроль	39,03 (8,43- 65,05)	7,61 (2,12- 14,90)	4.66 (0,86-5,69)	152.67 (132,67- 253,14)
СВ[7]	60,65 (14.25- 109,00)	19,33 * (12,56- 26,56)	1.98 (0-8,10)	196,48 (139,33- 256,00)
тафтсин	46,77 * (21,41- 145,80)	13,78 (9,47- 28,49)	3,28 (1,55-8,45)	212,19 (146,48- 321,71)
комплекс	63,40 * (14,38- 160,42)	20,17 * (15,67- 39,34)	7,93* (5,69- 16,72)	203,38 * (144,57- 330,76)

Примечания:* достоверные различия по сравнению с контролем. Данные оценены с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей)

Таблица 5.

Влияние комплекса тафтсина с СВ[7]ом на КонА-стимулированную продукцию цитокинов МНК ПК.

	ФНО α	ИНФ γ	ИЛ-2	ИЛ-10
контроль	333,75 (242,50- 684,17)	752,00 (199,67- 1516,33)	230,86 (122,24- 434,31)	709,81 (561.24- 956,00),
СВ[7]	626,67 (367,50- 916,66)	171,60 * (58,33- 453,00)	270,86 * (182,24- 512,93)	437,67 * (388,38- 499,33)
тафтсин	855,00 * (570,80- 1375,83)	459,00 (153,67- 1186,33)	405,69 (202,58 - 585,68)	662,67 (525,05- 910,29)
комплекс	1415,42 * (980,83 - 1723,33)	205,67 * (82,33- 731,67)	335,34 * (250,86- 542,93)	547,43 * (484.10- 678,38)

Примечания:* достоверные различия по сравнению с контролем. Данные оценены с помощью критерия Манна-Уитни и представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей)

Таким образом, действие свободного тафтсина и комплекса с СВ[7] различно. Предположительно, наблюдаемые различия в действии комплекса и свободного пептида могут быть связаны, во-первых, с предполагаемым нами пролонгированным действием комплекса, а во-вторых, с иммуномодулирующим действием комплексообразующего вещества – СВ[7].

Также было проведено исследование стимулированной КонаА продукции цитокинов МНК ПК при воздействии комплекса и свободных пептида и СВ[7] (Табл. 5). Показано, что свободный пептид повышал уровень стимулированной продукции только ФНО- α , а на остальные цитокины действия не оказывал. СВ[7] производил сложный эффект на стимулированные КонаА мононуклеары: понижал уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и провоспалительного ИНФ γ , но при этом повышал уровень провоспалительного ИЛ-2. Комплекс оказывал действие на все цитокины, продуцированные стимулированными КонаА клетками, повышая уровень ФНО- α и ИЛ-2, и снижая уровень ИНФ- γ и ИЛ-10.

Следовательно, влияние комплекса на цитокинпродуцирующую способность связано не только с действием иммуномодулятора тафтсина, но и с влиянием кукурбитурила на МНК ПК, хоть изначально нами предполагалось, что эта молекула будет биоинертной. Поскольку СВ[7] оказывал влияние на цитокины, продуцируемые лимфоцитами, и не влиял на синтез ФНО α , продуцируемый моноцитами и макрофагами, можно предположить, что иммуномодулирующее действие СВ[7] связано со стимулирующим действием на лимфоциты.

3.4. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на продукцию супероксидного радикала *in vitro* и *in vivo*.

Поскольку иммуномодулирующие свойства тафтсина проявляются в основном в стимуляции фагоцитирующих клеток, дальнейший интерес представляло исследование влияния комплекса на активацию данных клеток. В первую очередь было изучено влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами и макрофагами, определяемую в ходе НСТ-теста. (табл. 6).

Таблица 6.

Показатели НСТ-теста после воздействия комплекса СВ[7] с тафтсином, либо свободных СВ[7] и тафтсина, добавляемых при культивировании либо вводимых лабораторным животным, выраженные в условных единицах оптической плотности.

группы	нейтрофилы (<i>in vitro</i>)	макрофаги (<i>in vitro</i>)	макрофаги (<i>in vivo</i>)
контроль	0,269 (0,209- 0,282) (n=8)	0,450 (0,409- 0,524) (n=14)	0,204 (0,150- 0,240) (n=16)
СВ[7]	0,258 (0,238- 0,285) (n=8)	0,496 (0,451- 0,558) (n=14)	0,251 (0,167 - 0,291) (n=11)
тафтсин	0,363 (0,349- 0,415)* (n=8)	0,649 (0,636- 0,679) (n=14)*	0,285 (0,257- 0,305) * (n=18)
комплекс	0,388 (0,377- 0,416)* (n=8)	0,611 (0,605- 0,677) (n=14)*	0,241 (0,208- 0,305) * (n=18)

Примечания: Данные представлены в виде медианы (и 25; 75 перцентилей); n – размер выборки; * достоверные различия по сравнению с контролем.

Было выявлено, что комплекс тафтсина с СВ[7], так же, как и свободный пептид, достоверно повышает продукцию супероксидного радикала в реакции восстановления НСТ в экспериментах *in vitro* как у нейтрофилов, так и у перитонеальных макрофагов. Статистически значимых различий между продукцией супероксидного радикала клетками, инкубированными в присутствии комплекса и клетками, активированными свободным тафтсином, обнаружено не было. Важно, что сам СВ[7] не вызывает достоверных изменений в продукции супероксидного радикала

Сходная картина наблюдалась и при действии комплекса СВ[7] с тафтсином при его внутрибрюшинном введении лабораторным животным. В данном случае у мышей наблюдалась повышенная продукция супероксидного радикала резидентными перитонеальными макрофагами относительно контрольной группы. Введение свободного тафтсина также повышало уровень восстановления НСТ относительно контроля, что соответствовало уже известным данным о влиянии тафтсина на макрофаги *in vivo* (Chu *et al.*, 1990). Достоверных различий в продукции супероксидного радикала после введения комплекса и свободного пептида не наблюдалось. СВ[7] при внутрибрюшинном введении также, как и в исследовании *in vitro*, не влиял на способность клеток восстанавливать НСТ.

Следовательно, тафтсин в комплексе с СВ[7], как и свободный пептид, способен оказывать влияние на функциональную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов, увеличивая уровень продукции супероксидного радикала. Таким образом было показано, что полученный комплекс обладает действием *in vivo*, и связывание тафтсина с СВ[7] не снижает его биологической эффективности. СВ[7] в данном исследовании проявил себя как биологически инертная молекула, не влияя на синтез супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами.

3.5. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на показатели клеточности перитонеального экссудата мышей *in vivo*.

В отдельной серии экспериментов мы исследовали влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на количество клеток, содержащихся в перитонеальном экссудате лабораторных животных (табл. 7), с целью исследовать возможность тафтсина привлекать клетки макрофагального ряда в очаг воспаления дополнительно к резидентным макрофагам. При воспалении или стимуляции иммунитета в очаг воспаления дополнительно мигрируют моноциты с фенотипом, отличным от фенотипа резидентных макрофагов (Onoprienko, 2011). На сегодняшний день считается, что основная функция резидентных макрофагов – гомеостатическая и регуляторная, в противовес к макрофагам воспаления, играющим роль эффекторных клеток в воспалительных процессах.

Таблица 7.

Количество резидентных перитонеальных макрофагов, выделенных у групп животных после внутрибрюшного введения комплекса тафтсина с СВ[7], свободного тафтсина, свободного СВ[7] и PBS.

	Количество, млн Me (LQ; HQ)
контроль (n=16)	1,39 (1,22; 2,18)
СВ[7] (n=11)	2,40 (2,10; 3,22)
тафтсин (n=18)	2,40 (2,00; 3,90) *
комплекс (n=18)*	2,97 (1,96; 3,45) *

Примечание: n – размер выборки (число животных в каждой группе); * достоверные различия по сравнению с контролем.

Количество клеток, выделенных из перитонеального экссудата мыши через 48 часов после последнего введения растворов в контрольной группе животных после инъекций фосфатно-солевого буфера находилось в пределах 0,85 - 3 млн клеток от одного животного, в то время как в группе, получавшей внутрибрюшинные инъекции тафтсина, клеточность достоверно была выше и составляла 0,55 - 6 млн клеток.

Внутрибрюшинное введение комплекса также достоверно повышало количество клеток в выделенном перитонеальном экссудате (1,44 - 4,55 млн клеток).

В группе мышей, получавших СВ[7], количество клеток, выделенных из перитонеального экссудата, составило от 0,625 до 4,5 млн, при этом достоверных различий по сравнению с контролем не наблюдалось. Однако, как видно из таблицы 2, прослеживалась тенденция к увеличению числа клеток в перитонеальном экссудате.

Полученные результаты говорят о том, что комплекс, как и свободный тафтсин, увеличивает число привлекаемых воспалительных клеток, преимущественно состоящих из макрофагов и нейтрофилов, в брюшной полости.

3.6. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов.

Влияние комплекса на фагоцитоз оценивалось по поглощению эритроцитов барана (ЭБ) элиситированными перитонеальными макрофагами. Для оценки возможности пролонгированного действия комплекса исследование проводилось после 4 и 48-часового культивирования клеток (рис. 3) в различных условиях: в присутствии комплекса тафтсина с СВ[7], в присутствии свободного тафтсина, в присутствии свободного СВ[7], а также без дополнительного добавления каких-либо реагентов (рис. 4).

Было показано, что при культивировании в течение 4 часов комплекс, как и тафтсин, повышали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов *in vitro* ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Различий между действием свободного и комплексированного пептида не наблюдалось. СВ[7] так же повышал фагоцитарную активность клеток ($p < 0,05$), однако достоверно слабее, чем тафтсин. Следовательно, при 4-часовом культивировании тафтсин и комплекс тафтсина с СВ[7] обладают схожим действием на фагоцитоз перитонеальных макрофагов. Иммуностимулирующее действие СВ[7] на фагоцитарную активность клеток слабо выражено.

После 48-часовой инкубации (рис. 4) наблюдалось повышение фагоцитарной активности у клеток, культивированных с комплексом, относительно макрофагов, стимулированных свободным тафтсином ($p < 0,05$). Влияние тафтсина и СВ[7] на фагоцитоз при данном сроке культивирования было практически идентично – слабо повышено относительно контроля.

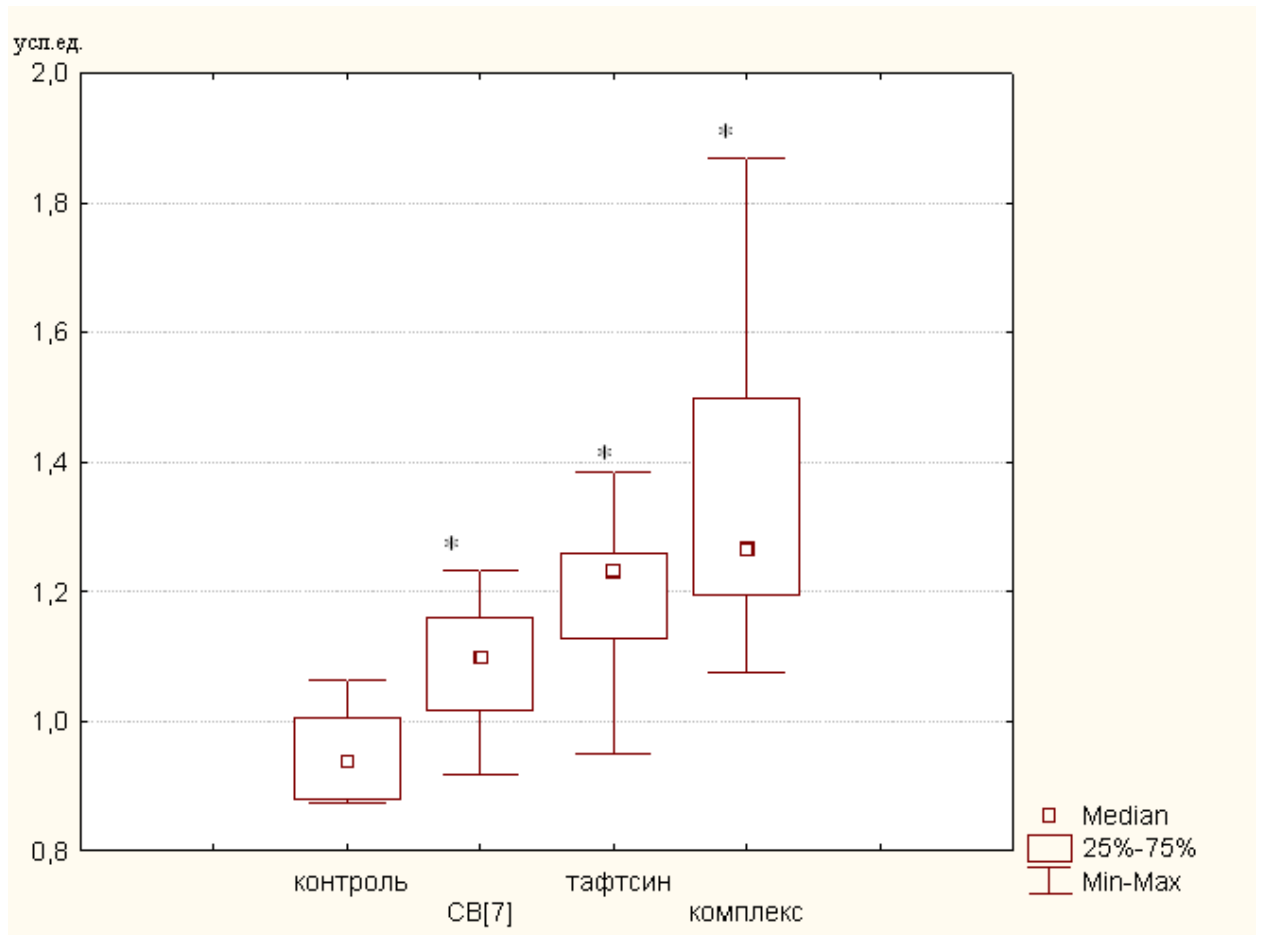


Рис. 3. Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на фагоцитоз *in vitro* перитонеальными макрофагами мыши (4 часа). * Достоверные различия по сравнению с контролем.

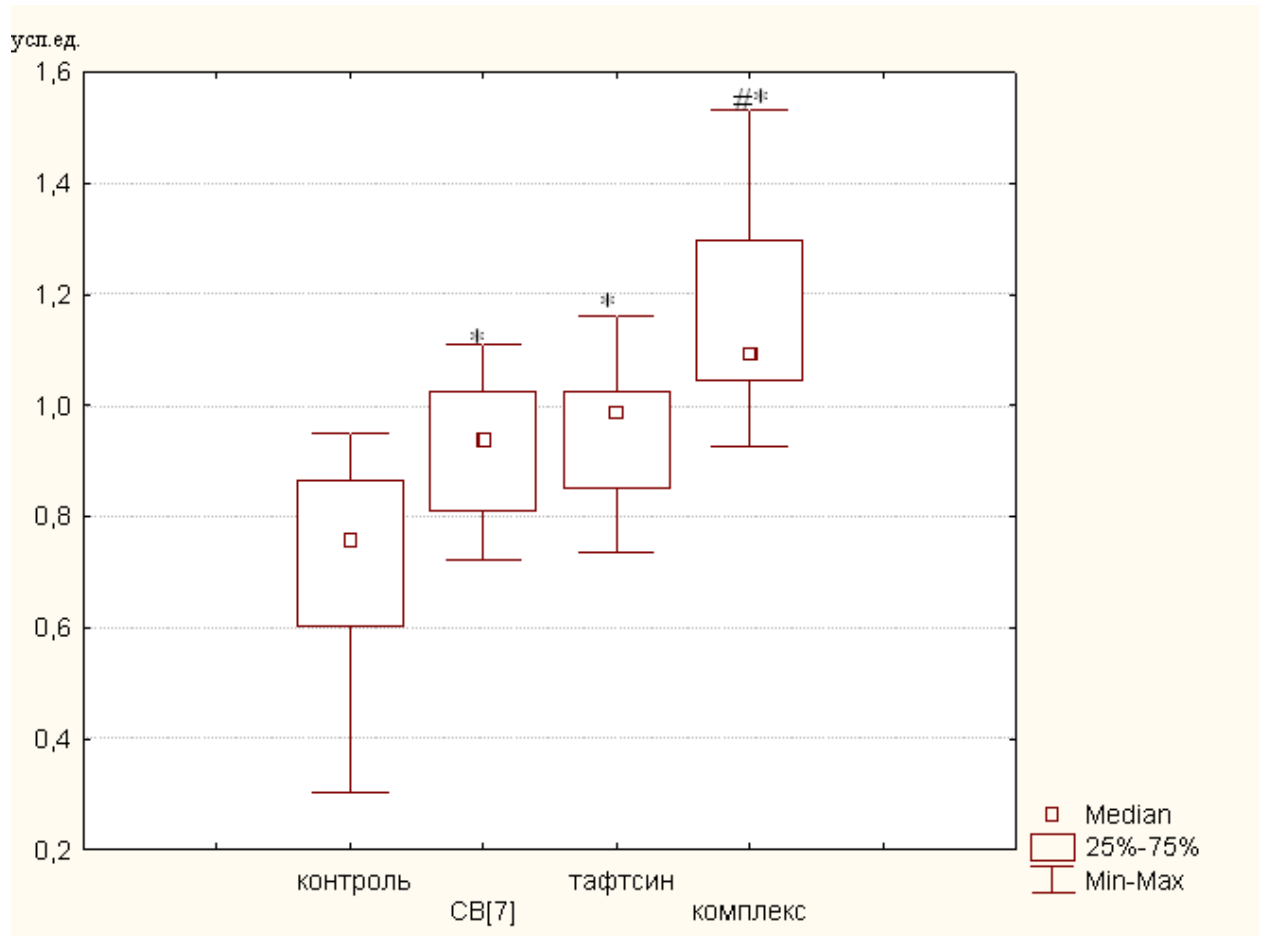


Рис. 4. Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на фагоцитоз *in vitro* перитонеальными макрофагами мыши (48 часов). * Достоверные различия с контролем. # Достоверные различия по сравнению со свободным тафтсином.

Таким образом, комплекс иммуномодулирующего пептида тафтсина с СВ[7] повышает фагоцитарную активность клеток как при 4-часовой, так и при 48-часовой инкубации. Свободный пептид также проявляет иммуностимулирующее действие, проявляющееся в усилении фагоцитоза, как при 4-часовой, так и при 48-часовой инкубации. Однако при увеличении срока культивирования показано усиление действия на фагоцитоз комплекса тафтсина с СВ[7] по сравнению со свободным пептидом. Свободный СВ[7] также проявляет себя как иммуномодулятор, усиливая фагоцитарную активность и при 4-часовой, и при 48-часовой инкубации.

3.7. Исследование влияния комплекса тафтсина с СВ[7] на реакции гуморального и клеточного иммунитета *in vivo*.

Поскольку известно, что тафтсин выступает не только в качестве стимулятора фагоцитоза, но и способен влиять на Т- и В- лимфоциты, следующим этапом стало исследование иммуномодулирующего действия комплекса *in vivo* на показатели гуморального и клеточного иммунитета – количество АОК и выраженность реакции ГЗТ.

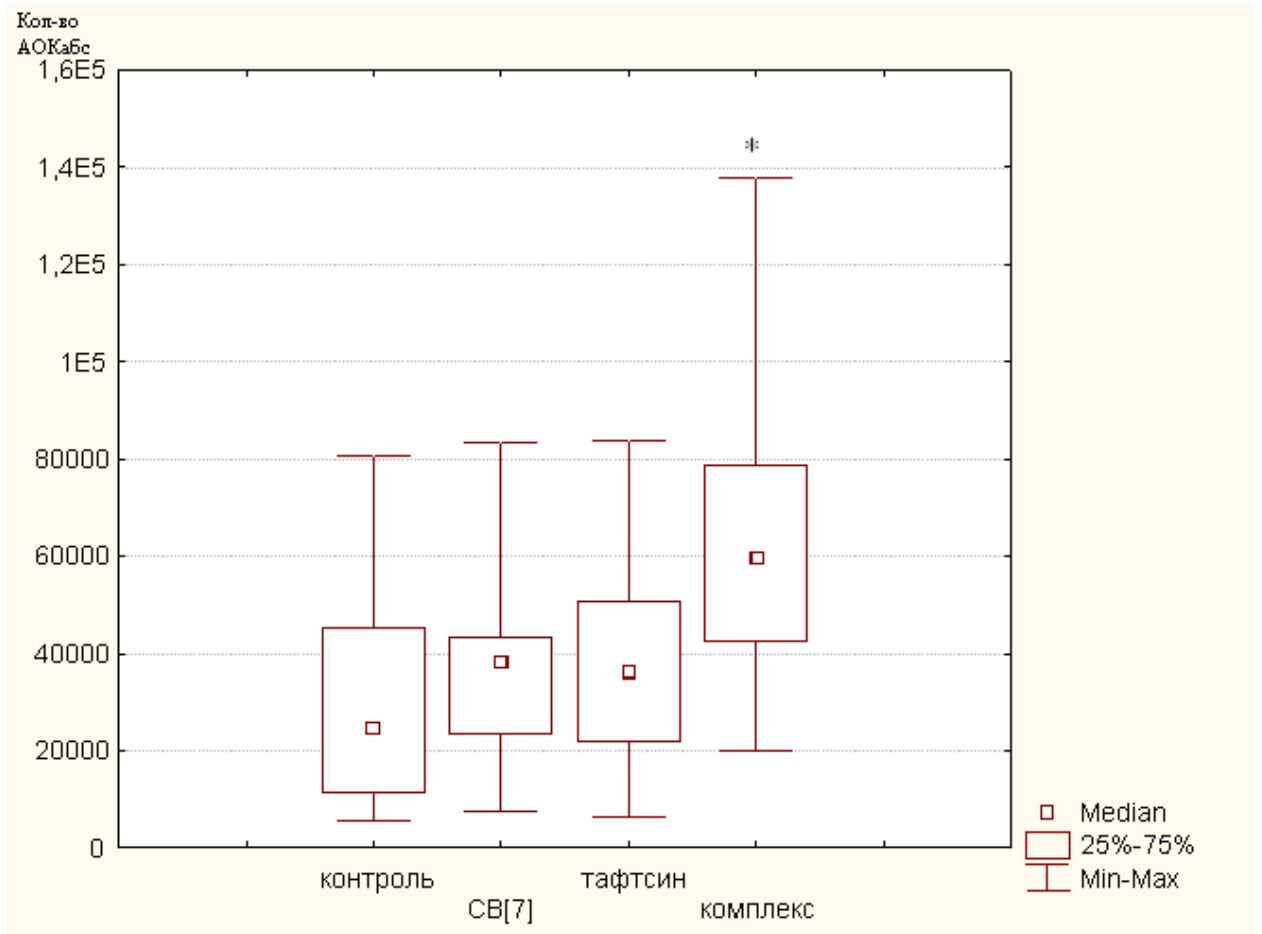


Рис.5. Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на количество АОК в селезенке у лабораторных животных.

* Достоверные различия по сравнению с контролем (критерий Вилкоксона).

После введения лабораторным животным комплекса пептида тафтсина с СВ[7] наблюдалось увеличение количества АОК в селезенке при развитии первичного иммунного ответа на тимусзависимый антиген (эритроциты барана) по сравнению с контролем (рис. 5). Свободный пептид не оказывал влияние на количество АОК. СВ[7] без иммуномодулирующего пептида не влиял на количество антителообразующих клеток. Таким образом, комплексообразование оказывало значительное влияние, усиливая иммуностимулирующее действие тафтсина, проявляющееся в увеличении количества АОК в селезенке мышей.

Показано, что и введение комплекса тафтсина с СВ[7], и введение свободного пептида тафтсина повышает выраженность реакции ГЗТ у мышей по сравнению с контролем (рис.6). Статистически значимых различий между действием комплекса и свободного пептида не обнаружено. СВ[7] не влиял на проявление реакции ГЗТ. Следовательно, в используемой дозе при используемой схеме введения комплекс СВ[7] с тафтсином влияет на показатели гуморального и клеточного иммунитета у лабораторных животных - стимулирует образование АОК в селезенке и вызывает повышение выраженности реакции ГЗТ в ответ на тимусзависимый антиген (ЭБ).

Следовательно, комплексообразование не влияло на выраженность клеточного иммунного ответа, и в то же время усиливало иммуномодулирующие свойства пептида, вызывая повышение антителообразования. Свободный пептид тафтсин в данном исследовании влиял на выраженность реакции ГЗТ, но при этом не изменял количество АОК в селезенке у лабораторных животных. СВ[7] в используемой дозе в данном исследовании не проявляет биологической активности.

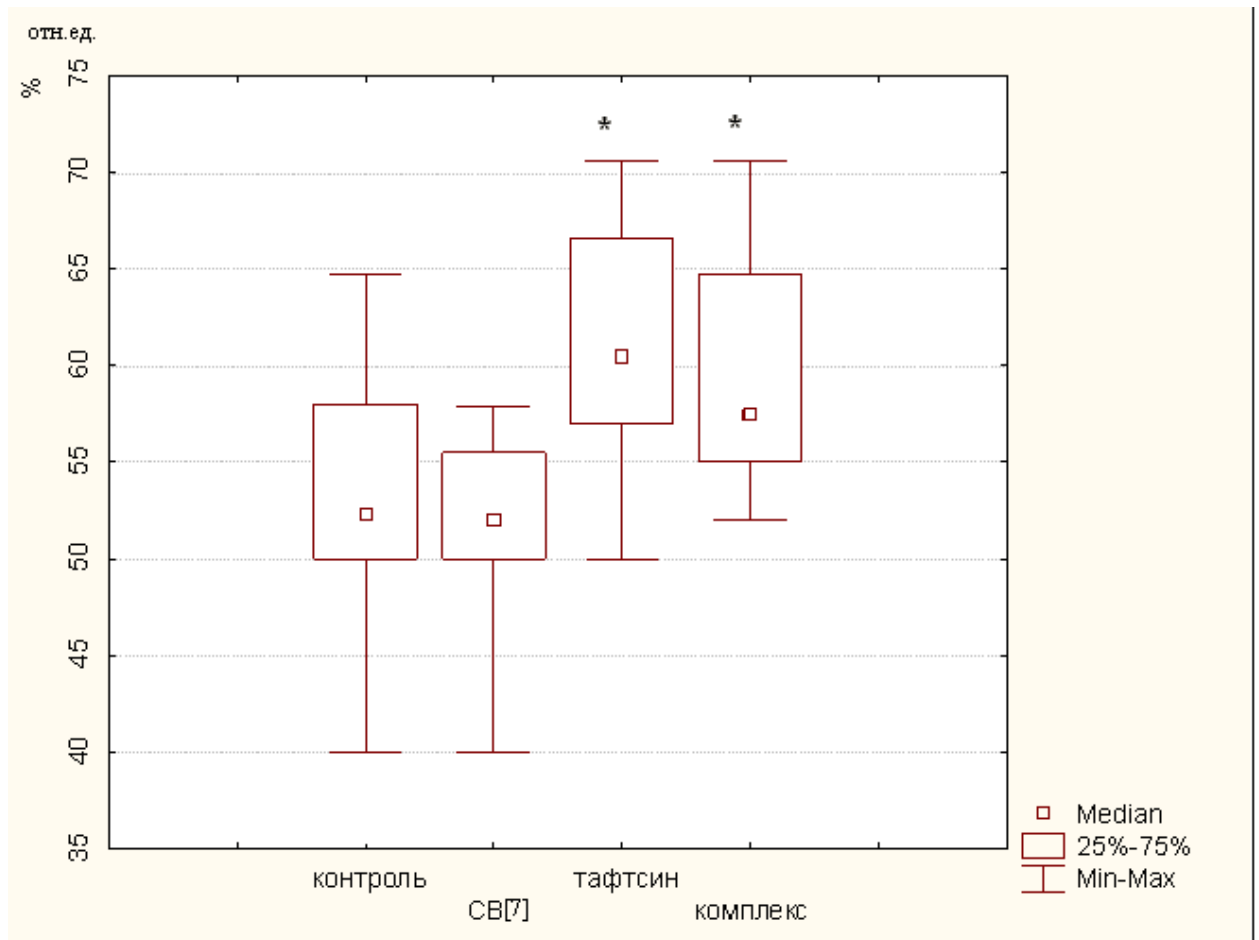


Рис. 5. Влияние комплекса тафтсина с СВ[7] на клеточный иммунитет

Примечания: * Достоверные различия по сравнению с контролем (критерий Вилкоксона).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Тафтсин, тетрапептид ТКРР - естественный иммуномодулятор, находящийся в крови человека и других млекопитающих и способный стимулировать лейкоциты. Тафтсин представляет собой соединение с широким спектром биологической активности - данный пептид повышает фагоцитоз, усиливает иммунный ответ, обладает бактерицидной, противоопухолевой и противогрибковой активностью (Siemion and Kluczyk, 1999). Впервые тафтсин был выделен в университете Тафтса в 1970 году, но, несмотря на более чем сорокалетнюю историю, исследование тафтсина и его производных является актуальным и в наше время. На сегодняшний день проводятся работы по созданию различных препаратов на базе тафтсина, в основном комплексы пептида с различными соединениями, обладающие иммуномодулирующим либо противоопухолевым действием (Bashi *et al.*, 2015; Ben-Ami Shor *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2014; Wardowska *et al.*, 2013)

С другой стороны, действие тафтсина кратковременно, а само соединение неустойчиво к действию внешних и внутренних факторов (Nishioka *et al.*, 1991) К тому же биodeградация тафтсина может привести к образованию ингибиторов тафтсина. Расположенная на плазматической мембране нейтрофилов человека лейцинаминопептидаза может вызывать образование эффективного ингибитора тафтсина, трипептида Lys-Pro-Arg, расщеплением самого тафтсина (Fridkin *et al.*, 1977).

В качестве метода стабилизации тафтсина нами было предложено комплексообразование с супрамолекулярным соединением СВ[7], которое нековалентно связывается с пептидом при помощи гидрофобных и электростатических взаимодействий, формируя комплекс типа «гость-хозяин». Как было сказано выше, СВ[7] способен образовывать комплексы с положительно заряженными аминокислотными остатками, входящими в состав белка или пептида. Следовательно, тетрапептид тафтсин имеет 2

возможных сайта связывания с СВ[7], поскольку содержит 2 положительно заряженные аминокислоты – лизин и аргинин. Поскольку при связывании с аминокислотными остатками СВ[7] защищает молекулу – «гостя» от действия ферментов, полученный комплекс будет иметь протективное влияние на пептид тафтсин.

Согласно литературным данным, СВ[7] с пептидами образует комплексы средней прочности – от $0,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и менее до $(78 \pm 35) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Hennig *et al.*, 2007). Полученная нами константа комплексообразования попадает в данный интервал - $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Следовательно, СВ[7] образует с тафтсином комплекс средней прочности, что является положительным моментом, поскольку высвобождение гостевой молекулы из высокопрочных комплексов скорее всего будет затруднено, а комплексы слабой прочности потребовали бы высоких концентраций супрамолекулярного соединения для поддержания стабильности в растворе. Поскольку комплекс является устойчивым в том случае, если $K_a \times C_0 > 1$, где C_0 = концентрация вещества, входящего в комплекс, то для соблюдения условий стабильности минимальная концентрация веществ в растворе, входящих в состав комплекса, не должна быть ниже чем $0,5 \times 10^{-3}$.

Концентрации исходных веществ для исследования иммуномодулирующего действия комплекса тафтсина с СВ[7] *in vitro* (0,5 мМ СВ[7] и 1 мкг/мл тафтсина) были подобраны нами исходя из полученной константы комплексообразования, данных о токсичности СВ[7] и оптимальной по созданию иммуномодулирующего эффекта пептида концентрации тафтсина в культуральной среде (Vabcock *et al.*, 1983; Jeon *et al.*, 2005; Hettiarachchi *et al.*, 2010). Аналогично были подобраны концентрации для опытов *in vivo* (25 мкг тафтсина в 0,25 мл 4М раствора СВ[7]) – исходя из константы комплексообразования и данных об оптимальной дозе пептида при внутрибрюшинном введении и данных о

токсичности СВ[7], полученных в ходе опытов на лабораторных животных (Chu and Nishioka, 1990; Uzunova *et al.*, 2010).

Согласно литературным данным, возможность действия тафтсина как фактора роста на иммунокомпетентные клетки исследовалось в основном при помощи метода оценки пролиферативной активности клеток по включению ³H-тимидина в ДНК. Как было показано, тафтсин обладает слабой митогенной активностью в отношении спонтанной пролиферации лейкоцитов периферической крови человека, а также мононуклеарных клеток селезенки и клеток костного мозга мыши, наибольший эффект был получен при концентрации пептида 1 мкг/мл (Nishioka *et al.*, 1980; Nishioka *et al.*, 1990). Согласно полученным нами данным, тафтсин в используемой концентрации не вызывал статистически значимых изменений в спонтанной пролиферативной активности МНК ПК.

Литературные данные по поводу влияния тафтсина на митоген-индуцированную пролиферативную активность лимфоцитов различаются, что вероятно связано с различными условиями проведения экспериментов. Так, тафтсин стимулирует пролиферацию спленоцитов, стимулированную ФГА или ЛПС, однако подавляет КонА-индуцированную пролиферацию лимфоцитов, выделенных у животных после инъекций пептида, что связывают со стимуляцией регуляторных клеток (Florentin *et al.*, 1978; Florentin *et al.*, 1986).

Присутствие СВ[7] в исследуемой дозе не влияет на клеточную пролиферацию, клеточный цикл и апоптоз МНК ПК, следовательно, в данном исследовании СВ[7] в используемой концентрации проявил себя как биоинертная молекула, не обладающая иммуномодулирующим действием. Поскольку полученный нами комплекс СВ[7] с тафтсином, так же, как и свободный тафтсин, не влиял на спонтанную либо стимулированную пролиферацию, полученные нами данные свидетельствуют о том, что

комплексообразование не изменяет действие тафтсина на пролиферативную активность клеток.

Поскольку в предыдущем исследовании СВ[7] не проявил иммуномодулирующей активности, мы предположили, что комплекс либо не будет влиять на способность клеток продуцировать цитокины, либо будет наблюдаться усиление продукции некоторых цитокинов вследствие защиты пептида от разрушения в культуральной среде под действием негативных факторов, что приведет к пролонгированию стимулирующего действия пептида на клетки, либо возможно негативное проявление последствий комплексообразования, проявляющееся в снижении цитокинпродуцирующей активности клеток. К настоящему времени проведено множество исследований, свидетельствующих о том, что тафтсин и его аналоги влияют на продукцию широкого спектра цитокинов различными иммунокомпетентными клетками, в том числе МНК ПК.

Известно, что иммунокомпетентные клетки при поглощении тафтсина и его аналогов способны выделять $\text{INF-}\gamma$ и $\text{TNF-}\alpha$ (Перельмутер и др., 2004). В опытах *in vitro* на мононуклеарах периферической крови показано отсутствие эффекта при добавлении пептида и в то же время повышение уровня указанных цитокинов при стимуляции аналогами тафтсина, что связывают с более быстрой биodeградацией нативного пептида (Paulesu *et al.*, 1992). Поэтому нами было проведено сравнение продукции $\text{INF-}\gamma$ и $\text{TNF-}\alpha$ МНК ПК, культивированными без каких-либо дополнительных активаторов, и клетками, культивированными в присутствии комплекса СВ[7] с тафтсином, а также клетками, культивированными с отдельными компонентами комплекса – свободным пептидом и СВ[7].

Согласно нашим данным, свободный тафтсин все же слабо стимулирует продукцию $\text{TNF-}\alpha$ как в случае спонтанной, так и в случае КонА-стимулированной продукции. Комплексообразование не влияло на спонтанную продукцию, но повышало стимулированную продукцию $\text{TNF-}\alpha$,

что может наблюдаться вследствие защиты от биодegradации и свидетельствовать в пользу большей эффективности комплекса по сравнению с нативным пептидом, поскольку свободный тафтсин не влиял на синтез данного цитокина МНК ПК.

В данном исследовании СВ[7] неожиданно проявил себя как иммуномодулятор, повышая уровень спонтанной продукции и понижая уровень КонА-стимулированной продукции INF- γ . В то же время свободный тафтсин не повлиял на спонтанную либо стимулированную продукцию INF- γ . Вполне возможно, что повышение уровня INF- γ в присутствии комплекса по сравнению с контролем связано с действием СВ[7], а не тафтсина. Вероятно, такой эффект прежде всего связан с влиянием различных компонентов комплекса на разные клетки, входящие в состав МНК ПК – лимфоциты и моноциты. Можно предположить, что в то время как свободный тафтсин активирует моноциты, стимулируя продукцию TNF- α , СВ[7] оказывает преимущественное действие на лимфоциты, поскольку INF- γ в большей степени продуцируется лимфоцитами.

Кроме того, следует отметить, что не все литературные источники свидетельствуют о стимулирующем либо нейтральном действии тафтсина и его аналогов на продукцию INF- γ , есть данные о снижении продукции цитокина, вызванные, по предположению авторов исследования, активацией супрессорного действия лимфоцитов (Bashi *et al.*, 2015; Florentin *et al.*, 1986). Следовательно, вполне возможно, что действие тафтсина на лимфоциты может зависеть от действия различных факторов, к примеру, от наличия костимуляторных сигналов.

Поскольку IL-2 и IL-10 тоже в первую очередь синтезируются лимфоцитами, влияние тафтсина на продукцию данных цитокинов предположительно может варьировать в зависимости от условий эксперимента, что подтверждается литературными данными. К сегодняшнему дню в различных исследованиях показано, что тафтсин

понижает, а аналог тафтсина повышает КонА-стимулированную продукцию IL-2 спленоцитами. Свободный пептид понижает продукцию IL-10 *in vitro*, но также известно, что тафтсин и комплекс тафтсина с фосфорилхолином при применении *in vivo* могут повышать продукцию IL-10 (Ben-Ami Shor *et al.*, 2015; Florentin *et al.*, 1986; Shakya *et al.*, 2012; Wardowska *et al.*, 2009)

Согласно полученным нами данным, в случае спонтанной продукции ни свободный тафтсин, ни СВ[7] не влияли на продукцию IL-2 и IL-10. Повышение уровня данных цитокинов под действием комплекса предположительно связано либо с синергическим эффектом, вызванным одновременным действием на клетки тафтсина и СВ[7], либо с пролонгированием действия пептида, из-за чего пептид оказывается способным осуществить стимулирующее действие на клетки.

В случае КонА- стимуляции продукции IL-2 и IL-10 свободный тафтсин также не оказывал эффекта, как и в случае спонтанной стимуляции. А СВ[7] вновь продемонстрировал иммуномодулирующее действие, повышая продукцию IL-2 и понижая синтез IL-10 МНК ПК. В связи с этим можно предположить, что действие комплекса (повышение продукции IL-2 и понижение – IL-10) в данном случае прежде всего вызвано иммуномодулирующим эффектом СВ[7].

Способность понижать уровень IL-10 одновременно со стимуляцией продукции TNF- α делает комплекс тафтсина с СВ[7] перспективным средством для применения в противоопухолевой терапии. Известно, что сам тафтсин обладает противоопухолевым действием, вызывая торможение опухолевого роста и процессов метастазирования (Raja Naresh *et al.*, 1996). Более подробное изучение противоопухолевых свойств комплекса СВ[7] с тафтсином выходит за рамки данной работы, однако является перспективным направлением в дальнейших исследованиях данного соединения.

Таким образом, действие свободного тафтсина и комплекса с СВ[7] различно. Предположительно, наблюдаемые различия во влиянии на

цитокинпродуцирующую активность МНК ПК комплекса и свободного пептида может быть связано, во-первых, с увеличением срока действия иммуномодулирующего пептида вследствие защиты от биodeградации, а во-вторых, с иммуномодулирующим действием комплексообразующего вещества – СВ[7], и в-третьих, с синергическим эффектом компонентов комплекса.

Дальнейшее изучение нами иммуномодулирующего действия комплекса СВ[7] с тафтсином *in vitro* было направлено на исследование функциональной активности фагоцитов, и в первую очередь на продукцию фагоцитами активных форм кислорода, поскольку уже известно, что тафтсин и его аналоги способны повышать уровень продукции супероксидного радикала вышеупомянутыми клетками (Spirer *et al.*, 1975; Dagan *et al.*, 1986). Свободная форма тафтсина, так же как и комплекс тафтсина с СВ[7] статистически достоверно повышали продукцию супероксидного радикала. Достоверных различий между действием свободного пептида и комплекса на продукцию супероксидного радикала иммунокомпетентными клетками *in vitro* не обнаружилось. Возможно, это связано с количеством разрушающих пептид ферментов в условиях культивирования *in vitro*, недостаточным для ферментной биodeградации молекул свободного пептида внеклеточными и внутриклеточными протеазами.

Кроме того, продукция супероксидного радикала при стимуляции комплексом тафтсина с СВ[7] была оценена и *in vivo*, и полученный результат практически совпадает с данными, полученными *in vitro*. Изначально предполагалось, что исследуемый комплекс будет эффективнее влиять на продукцию супероксидного радикала при введении препарата в организм экспериментальных животных в связи с пролонгированием стимулирующего действия тафтсина. Однако ожидаемого эффекта не было получено, что вероятно связано с тем, что комплекс в эксперименте *in vivo* может поддерживать постепенное высвобождение превышенного количества

пептида, вследствие чего не способен усилить стимуляцию продукции супероксидного радикала из-за превышения максимально эффективной дозы пептида. Важным фактом является продемонстрированное аналогичное действие комплекса и свободного пептида. В этой работе нами впервые было показано, что полученный комплекс обладает действием *in vivo* и *in vitro*, и связывание тафтсина с СВ[7] не снижает его биологической эффективности.

Известно, что увеличение продукции активных форм кислорода опосредует бактерицидный механизм фагоцитирующих клеток. Свободный пептид тафтсин, согласно литературным данным, также обладает антибактериальной активностью (Fridkin *et al.*, 1987). Следовательно, можно предположить, что комплекс будет повышать способность фагоцитирующих клеток противостоять бактериям, а возможно и другим патогенам, повышая бактерицидную активность клеток.

В отдельной серии экспериментов мы исследовали влияние комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом на показатели клеточности перитонеального экссудата мышей с целью изучить возможность тафтсина дополнительно привлекать клетки макрофагального ряда в очаг воспаления дополнительно к резидентным макрофагам. При воспалении или стимуляции иммунитета в очаг воспаления дополнительно мигрируют моноциты с фенотипом, отличным от фенотипа резидентных макрофагов (Onoprienko *et al.*, 2011). На сегодняшний день считается, что основная функция резидентных макрофагов – гомеостатическая и регуляторная, в противовес к макрофагам воспаления, играющих роль эффекторных клеток в воспалительных процессах.

Полученные результаты говорят о том, что комплекс, как и свободный тафтсин, увеличивает число привлекаемых воспалительных клеток, преимущественно состоящих из макрофагов и нейтрофилов, в брюшной полости, что соответствует литературным данным о влиянии иммуностимулирующего пептида тафтсина на миграцию и хемотаксис (Babcock *et al.*, 1983). Соответственно, усиление *in vivo* продукции активных

форм кислорода выделенными нами перитонеальными макрофагами может быть вызвано усиленной тафтсином миграцией воспалительных макрофагов, обладающей более выраженной фагоцитарной активностью по сравнению с резидентными макрофагами.

Однако результаты *in vitro* показывают, что при условиях, когда препараты вносятся после выделения клеток, а значит нет гетерогенности клеточного пула, вызванной разными условиями для миграции, все же наблюдаются достоверные различия по продукции супероксидного радикала между интактными клетками и клетками, инкубированными в присутствии тафтсина либо комплекса тафтсина с СВ[7]. Соответственно, полученные *in vivo* результаты по продукции супероксидного радикала отражают оба явления, происходящим вследствие влияния свободного пептида либо его комплекса – и повышение гетерогенности клеточного пула, и стимуляцию внутриклеточных процессов данными препаратами.

Тафтсин известен прежде всего как стимулятор фагоцитоза, усиливающего фагоцитарную активность моноцитов и макрофагов (Stabinsky *et al.*, 1980; Wardowska *et al.*, 2009). Полученные нами данные соответствуют результатам других исследователей – свободный тафтсин стимулирует фагоцитоз ЭБ перитонеальными макрофагами мыши как при 4-часовом, так и при 48-часовом сроках инкубации.

В данном эксперименте также СВ[7] проявляет себя как иммуномодулятор, оказывая слабое стимулирующее действие на фагоцитоз ЭБ перитонеальными макрофагами, что возможно связано с продемонстрированной нами стимуляцией продукции INF- γ в культуре *in vitro*. Макрофаги способны синтезировать INF- γ , а повышение продукции данного цитокина приведет к аутокринной стимуляции клеток.

Комплекс тафтсина с СВ[7], так же, как и свободный пептид, оказывал стимулирующее действие на фагоцитоз ЭБ перитонеальными макрофагами мыши и при 4-часовом, и при 48-часовом сроках инкубации. Важно

отметить, что при 48-часовой инкубации фагоцитарная активность клеток под действием комплекса была достоверно выше по сравнению с фагоцитарной активностью клеток, инкубированных со свободным тафтсином. Предположительно повышение активности обусловлено прежде всего пролонгированием действия комплекса, связанным с защитой от биодegradации, кроме того, данный эффект можно объяснить синергическим эффектом из-за совместного действия компонентов комплекса.

Таким образом, комплекс обладает более выраженным эффектом на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мыши при увеличении времени культивирования, что, возможно, свидетельствует о более длительном действии комплексирированной формы тафтсина вследствие протективного влияния СВ[7]. Данный эффект предположительно связан с защитой пептида тафтсина от биодegradации в условиях *in vitro*.

Следующим этапом работы была оценка иммуномодулирующего действия комплекса на показатели иммунитета *in vivo*: количество АОК в селезенке и выраженность реакции ГЗТ у лабораторных животных. Поскольку тафтсин главным образом стимулирует врожденный иммунитет, повышая продукцию прежде всего провоспалительных цитокинов, данный пептид и его аналоги могут усиливать как Th1, так и Th2 тип иммунного ответа (Jiang *et al.*, 2014).

Согласно полученным нами данным, тафтсин усиливает проявление реакции ГЗТ у лабораторных животных, что, возможно, связано с несколькими фактами. Во-первых, тафтсин стимулирует наработку цитокинов, способствующих усилению клеточного иммунного ответа, во-вторых, активируя макрофаги, пептид способствует улучшению клеточной кооперации антигенпрезентирующих клеток и Т-лимфоцитов (Tzeval *et al.*, 1978).

Из литературных источников следует, что пептид тафтсин усиливает реакцию ГЗТ в дозе 25 мкг/мышь, следовательно, полученные результаты соответствуют данным из литературных источников (Florentin *et al.*, 1986).

Различий при развитии клеточного иммунного ответа после иммунизации ЭБ между свободным и находящимся в комплексе пептидом обнаружено не было. Следовательно, комплексообразование не изменяет способность тафтсина влиять на интенсивность ГЗТ. Несмотря на то, что в части экспериментов СВ[7] обладал слабым иммуномодулирующим действием, в данном случае СВ[7] в используемой концентрации не влиял на выраженность реакции ГЗТ.

Тафтсин способен усиливать реакции гуморального иммунитета, повышая количество АОК в селезенке у лабораторных животных. Усиление приобретенного гуморального иммунитета может быть связано с улучшением клеточной кооперации АПК и Т-хелперов с последующим развитием Th2-клеток, либо с усилением продукции Th2-цитокинов. Согласно литературным данным, тафтсин повышает количество АОК при введении в дозе 20 мг/кг, в то время как в данном исследовании доза препарата на одну мышь гораздо ниже – 1,25 мг/кг (Florentin *et al.*, 1978). В данной дозе свободный тафтсин не оказывал влияния на количество АОК, а комплексированный пептид статистически достоверно повышал количество АОК. Поскольку СВ[7] не влиял на образование АОК в селезенке, эффект комплекса тафтсина с СВ[7] скорее всего связан с пролонгированием и усилением действия пептида. Соответственно, в эксперименте с АОК комплексообразование позволяет снизить дозу препарата более чем в 10 раз.

Таким образом было показано, что иммуномодулирующее действие свободного пептида тафтсина и комплекса тафтсина с СВ[7] различно. Предположительно, наблюдаемые различия в действии комплекса и свободного пептида могут быть связаны, во-первых, с предполагаемым нами пролонгированным действием комплекса, во-вторых, с иммуномодулирующим действием комплексообразующего вещества – кукурбит[7]урилы, и в-третьих, с синергическим эффектом компонентов комплекса. Важно отметить, что ни в одном из экспериментов

комплексообразование не подавляло иммуномодулирующее действие пептида.

Следовательно, изучение свойств комплекса СВ[7] с тафтсином, а также возможно и с другими пептидами, требует дальнейших исследований. Комплексообразование с СВ[7] лекарственных пептидов, содержащих положительные аминокислотные остатки, является перспективным направлением, позволяющим не только пролонгировать и защитить препарат от биодegradации в организме, но и усилить или модифицировать биологическое действие пептида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Иммуномодулирующий тетрапептид тафтсин формирует комплекс с СВ[7], способным защищать пептид от биодеградаци. Значение константы комплексообразования, характеризующее стабильность комплекса, было получено методом конкурентной флуоресцентной титрации и составило $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Данная константа будет зависеть от изоэлектрической точки белка, то есть при широком спектре значений рН (3 – 9) раствора, в котором может находиться комплекс, будет сохраняться на том же уровне, что позволяет комплексу оставаться стабильным в различных физиологических средах организма, обладающих различным уровнем рН.

Было показано, что комплекс тафтсина с СВ[7] не влияет на пролиферативную активность МНК ПК здоровых доноров при спонтанной пролиферации. В случае стимулирования пролиферации митогеном КонА наблюдается схожая ситуация – добавление в культуру комплекса тафтсина с СВ[7] не приводит к изменению пролиферативной активности стимулированных митогеном клеток. Свободные пептид и СВ[7] также не влияют на пролиферацию моноклеаров как в случае спонтанной пролиферативной активности, так и при стимулировании митогеном.

Таким образом, в используемых дозах ни комплекс тафтсина с СВ[7], ни свободный пептид, ни кавитанд по отдельности не влияют на пролиферацию МНК ПК как в случае спонтанной, так и в случае митогениндуцированной пролиферативной активности.

Было показано, что комплекс СВ[7] с тафтсином повышал уровень спонтанной продукции всех исследуемых цитокинов, в то время как свободный пептид активировал продукцию только ФНО α .

При стимуляции клеток КонА свободный пептид повышал уровень стимулированной продукции только ФНО- α . Комплекс тафтсина с СВ[7]

оказывал действие на все цитокины, повышая уровень ФНО- α и ИЛ-2, и снижая уровень ИНФ- γ и ИЛ-10.

Кукурбит[7]урил не влияет на способность нейтрофилов и перитонеальных макрофагов продуцировать супероксидный радикал. Комплексообразование тафтсина с СВ[7] не изменяет способности пептида стимулировать продукцию супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Свободный пептид проявляет иммуностимулирующее действие, проявляющееся в усилении фагоцитоза, как при 4-часовой, так и при 48-часовой инкубации. Однако при увеличении срока культивирования с 4 часов до 48 часов показано статистически значимое повышение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов под действием комплекса по сравнению с влиянием на клетки свободного пептида, что свидетельствует об усилении действия на фагоцитоз комплекса по сравнению со свободным пептидом.

Комплексообразование значительно усиливало иммуностимулирующее действие тафтсина, проявляющееся в увеличении количества АОК в селезенке мышей.

Показано, что и введение комплекса тафтсина с СВ[7], и введение свободного пептида тафтсина повышает выраженность реакции ГЗТ у мышей по сравнению с контролем. Статистически значимых различий между действием комплекса и свободного пептида не обнаружено.

ВЫВОДЫ

1. Тетрапептид тафтсин образует комплекс по типу «гость-хозяин» с СВ[7], константа связывания, характеризующая стабильность комплекса, составляет $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

2. СВ[7] в концентрации 0,5мМ повышает спонтанную продукцию ИНФ- γ МНК ПК и модулирует КонА-индуцированную продукцию цитокинов, понижая уровень ИНФ- γ и ИЛ-10 и повышая уровень ИЛ-2, а также стимулирует Fc-опосредованный фагоцитоз перитонеальными макрофагами мыши, что указывает на его иммуностимулирующее действие.

3. Комплекс СВ[7] с тафтсином повышает уровень спонтанной продукции ФНО- α , ИНФ- γ , ИЛ-2 и ИЛ-10, в то время как свободный пептид активирует продукцию только ФНО- α . При стимуляции клеток КонА свободный пептид повышает уровень стимулированной продукции только ФНО- α , не влияя на продукцию остальных цитокинов. Комплекс оказывает действие на цитокины, продуцированные стимулированными КонА клетками, повышая уровень ФНО- α и ИЛ-2 и снижая уровень ИНФ- γ и ИЛ-10, что говорит о его более широком спектре действия комплекса на цитокинпродуцирующую активность МНК ПК по сравнению со свободным тафтсином.

4. При коротком сроке культивирования тафтсин и его комплекс с СВ[7] обладают схожим стимулирующим действием, одинаково усиливая Fc-опосредованный фагоцитоз перитонеальными макрофагами, в то время как при увеличении срока культивирования комплекс проявляет более выраженный стимулирующий эффект на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, чем свободный пептид.

5. Комплекс тафтсина с СВ[7], в отличие от свободного пептида, увеличивает число антителообразующих клеток в селезенке у мышей после внутрибрюшинного введения соединений, что свидетельствует о стимулирующем влиянии комплекса на продукцию антител.

6. Свободная форма тафтсина, так же как и комплекс тафтсина с СВ[7] стимулируют продукцию супероксидного радикала перитонеальными макрофагами и нейтрофилами мыши и повышают выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа у лабораторных животных. Следовательно, комплексообразование тафтсина с СВ[7] не влияет на способность пептида повышать продукцию супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами как *in vitro*, так и *in vivo*, а также стимулировать реакцию гиперчувствительности замедленного типа *in vivo*.

7. Комплексообразование тафтсина с СВ[7] расширят спектр воздействия на цитокинпродуцирующую способность МНК ПК и усиливая стимулирующее влияние на фагоцитоз при длительном сроке культивирования и повышая продукцию антител *in vivo*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арион В.Я. Тактивин (Т-активин) и его иммунобиологическая активность // Иммунобиология гормонов тимуса: Под ред. Ю.А. Гриневича и В.Ф. Чеботарева. Киев: Здоровья, 1989. - С. 103-125.
2. Р. И. Атауллаханов, Р.Д.Холмс, А. В. Катлинский, П.Г.Дерябин, А. Н. Наровлянский, М. В. Мезенцева, Ф. И. Ершов Иммуномодулятор «Гепон» подавляет репликацию вируса гепатита С в клетках человека *in vitro* // Антибиотики и химиотерапия. - 2002, т. – 47. - №8. - с.9-11.
3. Атауллаханов Р.И., Катлинский А.В., Холмс Р.Д., Мастернак Т.Б., Ларин А.С., Малкина Е.Ю., Шишкова Н.М. Усиление образования антител под влиянием иммуномодулятора Гепон // Иммунология, 2003. - №1. -с.9-11.
4. Величко Т.В. Применение иммунофана в комплексной терапии эндогенных увеитов у детей. // Дисс. к.м.н. – М., 2005.
5. Герасько О.А., Самсоненко Д. Г., Федин В.П. Супрамолекулярная химия кукурбитурилов // Успехи химии. – 2002. -.Т.71(9). – С.840–861.
6. Григорьева И.Н., Кедрова А.Г., Кузнецов В. В., Подистов Ю.И., Глазкова О.А., Афанасьева Е.Н. Применение противовирусных и иммуномодулирующих лекарств у больных преинвазивным раком шейки матки / Российский онкологический конгресс, 11-й: Материалы. – М., 2007.
7. Замятнин А.А. Физико-химические особенности эндогенных регуляторных олигопептидов // Биофизика. 1990. Т. 35. -№ 4. -С. 555-559.

8. Замятнин А.А. Общие функциональные особенности эндогенных регуляторных олигопептидов // Физиологический журнал. - 1992. - Т.78. -№ 9. - С. 39-51.
9. Замятнин А.А. Классификация эндогенных регуляторных олигопептидов и анализ их структурно-функциональных особенностей // автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / М., 1991.
10. Иванов С.Д., Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Кованько Е.Г., Ямшанов В.А. Влияние виллона на последствия повторных радиационно-ртутных воздействий в малых дозах // Успехи геронтол. —2005.— Вып. 16. — С. 88–91.
11. Иллек Я.Ю., Сулова Е.В., Зайцева Г.А., Сулов И.Н. Терапевтический и иммуномодулирующий эффекты имунофана при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у детей // Экология человека. - 2007. т.№ 9.-С.20-23.
12. Катлинский А.В., Атауллаханов Р.И., Холмс Р.Д., Пичугин А.В. и др. Иммуноадьювантное действие структурных гомологов иммуномодулятора Гепон. // Иммунология - 2003 - №1 - с.12-14.
13. Клодт П.М., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Козловская М.М., Майский А.И., Раевский К.С. Изучение эффектов гектапептидаселанка на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс вистар // Психофармакология и биологическая наркология. – 2005. – Т.5. – С. 984-989.
14. Козловская М.М. и др. Сравнительный анализ структурно-функциональных особенностей пептидного препарата селанка // Психофармакол. биол. наркол. — 2002. — Т. 2, № 1–2. — С. 203–210.

15. Кополодзе, Р.А. Регламентация экспериментов на животных – этика, законодательство, альтернативы / Р.А.Кополодзе // Успехи физиологических наук. – 1998. – №4. – С. 74-93.
16. Кузник Б.И., Абдулаев Х.Р., Витковский Ю.А., Лиханов И.Д., Цыбиков М.Н., Цыбиков Н.Н. Сравнительное действие тималина, эпителина и вилона на состояние иммунитета больных с осложненным течением аппендицита // Медицинская Иммунология 2008 - Т. 10. - № 4-5. С.455-462.
17. Лебедев В. В., Шелепова Т. М., Степанов О. Г. и др. Иммунофан — регуляторный пептид в терапии инфекционных и неинфекционных болезней. М.: Изд. Праминко. – 1998. - С.119.
18. Любимов Г.Ю., Зенков Н.К., Вольский Н.Н. Хемилюминесценция перитонеальных макрофагов при действии макрофаг-активирующего фактора // Иммунология. - 1992. - №1. – С. 40–43.
19. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Выделение из костного мозга, лимфоцитов и тимуса полипептидов, регулирующих процессы межклеточной кооперации в системе иммунитета // Докл. АН СССР. 1981. - Т. 261. - № 1. - С.235-239.
20. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимомиметики. СПб: Наука. -2000. -158 с.
21. Новокшенов А. А., Соколова Н. В., Галеева Е. В., Курбанова Г. М., Портных О. Ю., Учайкин В. Ф. Иммунотерапия при острых кишечных инфекциях у детей. Опыт использования нового иммуномодулятора Гепон // Детские инфекции. - 2003. -№1. -С.32-36.
22. Обыденко В.И., Патеюк А.В., Кузник Б.И. Влияние вилона на регенерацию ожоговой раны, морфологию тимуса и надпочечников

- у животных в условиях эксперимента // Забайкальский медицинский вестник. - 2009. -С. 1-4.
23. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия Москва, "Просвещение" 1987.- 816 С.
24. Олферьев М.А., Боженко В.К., Лунин В.Г., Кулинич Т.М., Бубнов В.В. Использование технологии проникающих пептидов для доставки физиологически активных пептидов внутрь клетки. //Серия. Критические технологии. Мембраны – 2003. - № 17. – С.31-35.
25. Павлов Т.С., Самонина Г.Е. Новое свойство эндогенного иммуностимулятора тафтсина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2004. - Т. 138 - № 8. - С.185-187.
26. Перельмутер В.М., Одинцов Ю.Н., Климентьева Т.К. Тафтсин – естественный иммуномодулятор. Возможная роль в опухолевой прогрессии // Сибирский онкологический журнал. – 2004. - №4. – С.57-62.
27. Р. В. Петров, А. А. Михайлова, Л. А. Фомина. Костномозговые иммунорегуляторы миелопептиды // Российский Химический Журнал. – 2005. - Том XLIX. - № 1. - С.55-64.
28. Семенова Т.П., Козловская М.М., Вальдман А.В., Громова Е.А. Влияние тафтсина и его аналогов на обучение, память и исследовательское поведение крыс // Журн. высш. нервн. деят. — 1988. — Т. 38, № 6. — С. 1033–1037.
29. Семенова Т.П., Гуревич Ч.В., Козловская М.М., Громова Е.А. О роли моноаминергических систем мозга в эффектах тафтсина и его аналога на эмоциональное поведение животных // Физиолог, журн. СССР им. И.М. Сеченова. – 1989. - т. 75. - № 6. - С. 759-765.
30. ред. Смирнов В.С. Клиническая фармакология тимогена // 2003. – СПб. 106 С.

31. Суковатых Б.С., Орлова А.Ю., Артющкова Е.Б. Влияние плазмы, обогащенной тромбоцитами, и препарата «миелопид» на течение острой и хронической ишемии нижних конечностей // Новости хирургии. 2012. – Т. 20. - №2. – С.41-48.
32. Фомина Л.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А., Смирнова О.В. Миелопептиды: выделение и структура // Биоорганическая химия. – 1998. - №6. – С.403-407.
33. Хавинсон В.Х., Серый С.В., Малинин В.В. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью: Патент РФ № 2080120. 1997.
34. Хавинсон В.Х., Егорова В.В., Тимофеева Н.М. Влияние пептидов вилона и эпигаллона на всасывание глюкозы и глицина в различных отделах тонкой кишки старых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2002.-.133. - №5.- С.570-573.
35. Чипенс Г.И. Применение некоторых принципов системного анализа в исследовании структур и функций пептидных лигандов // Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига. -1980. - С.11-124.
36. Яковлев Г.М., Новиков В.С., Смирнов В.С. и др. Механизмы биорегуляции. СПб: Наука. 1992. - 40 С.
37. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. – М. Мир. – 1985. -456 С.
38. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 2004 – 608 С.
39. Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Woo Joo S. Liposome: classification, preparation, and applications // Nanoscale Research Letters – 2013. - V. 8. – P.102-111.
40. Ali M. and Manolios N. Peptide delivery systems. // Letters in peptide science – 2002. – V. 8. - P.289–294.

41. Amano D., Kagosaki G., Usui T. et al. Inhibitory effects of superoxide dismutase and various other protein on the nitroblue tetrazolium reduction by phagocytizing guinea pig polymorphonuclear leucocyte // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1975. – V.66. – P.272–279.
42. Amaro M.I., Tewes F., Gobbo O., Tajber L., Corrigan O.I., Ehrhardt C., Healy A.M. Formulation, stability and pharmacokinetics of sugar-based salmon calcitonin-loaded nanoporous/nanoparticulate microparticles (NPMPs) for inhalation // *Int J Pharm.*- 2015 – V.483(1-2). –P.6-18.
43. Anderson D.C. Tumor cell retention of antibody Fab fragments is enhanced by an attached HIV TAT protein-derived peptide. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. -V.194. – P.876–884.
44. Ansary R.H., Awang M.B., Rahman M.M. Biodegradable Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-Based Micro/Nanoparticles for Sustained Release of Protein Drugs // *A Review Trop J Pharm Res.* – 2014. – V.13 (7). – P.1179
45. Babcock G.F., Amoscato A.A., Nishioka K. Effect of tuftsin on the migration, chemotaxis, and differentiation of macrophages and granulocytes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1983. – V.419. – P.64-74.
46. Barichello J.M., Morishita M., Takayama K., Nagai T. Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. // *Int. J. Pharm.* – 1999. - V.184. – P.189–198.
47. Bashi T., Blank M., Ben-Ami Shor D., Fridkin M. et al. Successful modulation of murine lupus nephritis with tuftsin-phosphorylcholine. // *J Autoimmun.* - 2015. - V.59. -P.1-7.
48. Ben-Ami Shor D., Bashi T., Lachnisch J., Fridkin M. et al. Phosphorylcholine-tuftsin compound prevents development of dextran sulfate-sodium-salt induced murine colitis: implications for the treatment of human inflammatory bowel disease // *J Autoimmun.* - 2015. - V.56. - P.111-117.

49. Behrand R., Meyer E., Rusche F. About condensations product from glycoluril and formaldehyde. // *Liebigs Ann. Chem.* 1905. - V. 339. - P.1-37.
50. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* – 1968. – Vol. 97. – P.7.
51. Bruce A. - Clinical considerations in pegylated protein therapy. - From Reserch to Practice. – 2001. – V. 3(1) - P.3-9.
52. Bush M.E., Bouley N.D., Urbach A.R. Charge-mediated recognition of N-terminal tryptophan in aqueous solution by a synthetic host // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005 – V.127. – P.14511-14517.
53. Buschmann H.J., Mutihac L., Mutihac R.C., Schollmeyer E. Complexation behavior of cucurbit[6]uril with short polypeptides // *Therm. Acta.* - 2005. – V. 430. – P.79-82.
54. Cai Y., Xu M., Yuan M., Liu Z., Yuan W. Developments in human growth hormone preparations: sustained-release, prolonged half-life, novel injection devices, and alternative delivery routes. // *Int. J. Nanomedicine.* - 2014. – V.9. -P.3527-3538.
55. Cao L., Hettiarachchi G., Briken V., Isaacs L. Cucurbit[7]uril Containers for Targeted Delivery of Oxaliplatin to Cancer Cells // *Angewandte Chemie International Edition.* – 2013. -V.52. -P. 12033–12037.
56. Chandrasekar M., Jagdish S. Insulin loaded PLGA microspheres: Effect of zinc salts on encapsulation, release, and stability. // *J. Pharm. Sci.*- 2009. – V.98. –P.529-542.
57. Chen H., Chan J.Y.W., Yang X., Ian W et al. Developmental and organ-specific toxicity of cucurbit[7]uril: in vivo study on zebrafish models // *RSC Adv.* – 2015. – V.5. – P.30067-30074.
58. Chu D.Z., Nishioka K. Tuftsin increases survival in murine peritoneal carcinomatosis // *J Biol Response Mod.*- 1990. – V.9(2). – P.264-267.

59. Cong H., Tao L.L., Yu Y.H., Yang F., Du Y., Xue S.F., Tao Z.
Molecular recognition of amino acid by cucurbiturils // *Acta Chim. Sin.* – 2006. - V.64. – P.989–996.
60. Cunningham A. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells // *Nature* – 1965 - №207- P.1106-1107.
61. Dagan S., Gottlieb P., Tzevalov E. et al. Tuftsin analogues: synthesis, structure-function relationships, and implications for specificity of tuftsin's bioactivity // *J. Med. Chem.* -1986. –V.9. – P.1961-1962.
62. Dardenne M. Role of thymic peptides as transmitters between the neuroendocrine and immune systems. // *Ann Med.* – 1999. – V.31. – P.34-39.
63. Day A., Arnold R.J., Blanch R.J., Snushall J. Controlling factors in the synthesis of cucurbituril and its homologues // *J. Org. Chem.* 2001 -. V. 66 (24). - P. 8094-8100.
64. Damian P., Buck P., Abeysinghe M., Cullinane C. et al. Inclusion complexes of the antitumour metallocenes Cr_2MCl_2 (M = Mo, Ti) with cucurbit[n]urils. // *Dalton Trans.* - 2008 - P.2328-2334.
65. Denes L., Szende B., Ember J., Major J., Szporny L. et al.
Immunoregulating peptides II. In vitro effects of TP5 analogs on E-rosette formation and cell division // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* - 1987. - V. 9(1). - P.1-18.
66. Diwu Z., Zhang C., Klaubert D.H. and Haugland R. P.
Fluorescent molecular probes VI: The spectral properties and potential biological applications of water-soluble Dapoxyl™ sulfonic acid // *J. Photochem. Photobiol.* – 2000. - V. 131. - P.95–100.
67. Dulal P. Protein or Peptide drugs: Applications, Problems and Solutions // *Biotechnology Society of Nepal (BSN)* - 2010 -V.2. - P.1-5.
68. Edwards C.M.B., Cohen M.A., Bloom S.R. Peptides as drugs // *Q.J. Med.* – 1999. - V.92. – P.1-4.

69. Fabry Z., Raine C.S., Hart M.N. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. // *Immunol. Today*. – 1994. - V.15 (5) - P.218-24.
70. Florentin I., Bruley-Rosset M., Kiger N., Imbach J.L. et al. In vivo Immunostimulation by Tuftsin// *Cancer Immunol. Immunother.* - 1978. - V.5. – P.211-216.
71. Florentin I., Chung V., Martinez J., Maral J., Le Garrec Y., Mathé G. In vivo immunopharmacological properties of tuftsin (Thr-Lys-Pro-Arg) and some analogues // *Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* – 1986. - V.8(2). – P.73-80.
72. Freeman W.A., Mock W.L., Shih N.-Y. Cucurbituril. // *J. Am. Chem. Soc.* 1981.- V. 103. -P. 7367.
73. Fridkin M., Stabinsky Y., Zakuth V., Spirer Z. Tuftsin and some analogs: synthesis and interaction with human polymorphonuclear leukocytes // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977 - V.496 (1). - P.203-211.
74. Fruehauf S., Veldwijk M.R., Kramer A., Haas R., Zeller W.J. Delineation of cell cycle state and correlation to adhesion molecule expression of human CD34⁺ cells from steady-state bone marrow and peripheral blood mobilized following G-CSF-supported chemotherapy // *Stem Cells*. – 1998. – V16. – N.4. – P.271-279.
75. Fujiwara H., Arakawa H., Murata S., Sasaki Y. Entropy Changes in the Inclusion Complex Formation of α -Cyclodextrin with Alcohols as Studied by the Titration Calorimetry // *Bull. Chem. Soc. Jpn.*- 1987 - Vol. 60 - P.3891 – 3894.
76. Gere-Paszti E., Cserhati T., Forgacs E. Interaction of Hydroxypropyl- β Cyclodextrin with Peptides, Studied by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005. – V.28. – P.2619–2632.

77. Glue P., Fang J., Sabo R. et al. - Peg - interferon - alfa2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and preliminary efficacy data. // *Hepatology*. – 1999. – V.30. – P.189-191.
78. Goyal P., Goyal K., Kumar S.G., Singh A., Katare O.P., Mishra D.N. Liposomal drug delivery systems – clinical applications // *Acta Pharm.* – 2005. – V.55. – P.1-25.
79. Irie T., Uekama K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery // *K. J. Pharm. Sci.* - 1997. – 86. –P.147–162.
80. Jain R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. // *Biomaterials* – 2000 – V.21. – P.2475-90.
81. Jain S.S., Jagtap P.S., Dand N.M., Jadhav K.R. et al. Aquasomes^ a novel drug carrier // *Journal of Applied Pharmaceutical Science* – 2012. – V.02 (01). –P.184-192.
82. Jain A., Gulbake A., Shilpi S., Hurkat P., Jain S.K. Peptide and protein delivery using new drug delivery systems. // *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* - 2013. -V.30 (4).- P.293-329.
83. Jang Y., Natarajan R., Ko Y.H., Kim K. Cucurbit[7]uril: A High-Affinity Host for Encapsulation of Amino Saccharides and Supramolecular Stabilization of Their α -Anomers in Water // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2014. - P.53. - 1003–1007.
84. Jiang X, Yu M, Qiao X, Liu M et al., Up-regulation of MDP and tuftsin gene expression in Th1 and Th17 cells as an adjuvant for an oral *Lactobacillus casei* vaccine against anti-transmissible gastroenteritis virus // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2014. –V.98 (19) - P.8301-8312.
85. Jeon Y.J., Kim S.Y., Ko Y.H., Sakamoto S. et al. Novel molecular drug carrier: encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug // *Org. Biomol. Chem.* – 2005. - V. 3. – P.2122-2125.

86. Jintian H., Meiyan F., Xianglian Z., Shufen M. et al. Stabilization and encapsulation of recombinant human erythropoietin into PLGA microspheres using human serum albumin as a stabilizer. // *Int. J. Pharm.* – 2011. – V.416. – P.69–76.
87. Heitmann L.M., Taylor A.B., Hart P.J., Urbach A.R. Sequence-specific recognition and cooperative dimerization of N-terminal aromatic peptides in aqueous solution by a synthetic host // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V.128 – P.12574-12581.
88. Hennig A., Ghale G., Nau W.M. Effects of cucurbit[7]uril on enzymatic activity // *Chem. Commun.* – 2007. – P.1614-1616.
89. Hershfield M. S., Buckley R. H., Greenberg M. L. et al. -Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol - modified adenosine deaminase. - *N. Engl. J. Med.*- 1987. – V.316. – P.589-596.
90. Hettiarachchi G., Nguyen D., Wu J. et al. Toxicology and Drug Delivery by Cucurbit[n]uril Type Molecular Containers // *PLoS. One.* – 2010. - V6;5(5). – P.10514.
91. Horský J., Pitha J. Inclusion complexes of proteins: Interaction of cyclodextrins with peptides containing aromatic amino acids studied by competitive spectrophotometry // *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry* 1994. – V.18 (3) - P.291-300.
92. Kamei N., Takeda-Morishita M. Brain delivery of insulin boosted by intranasal coadministration with cell-penetrating peptides // *J. Control Release.* – 2015. – V.197. – P.105-110.
93. Kedar E., Gur H., Babai I. et al. Delivery of cytokines by liposomes: hematopoietic and immunomodulatory activity of interleukin-2 encapsulated in conventional liposomes and in long circulating liposomes. // *J. Immunother.* - 2000. – 23. - P.131-45.
94. Kemp S., Wheate N.J., Wang S., Collins J.G., Ralph S.F., Day A.I., Higgins V.J., Aldrich-Wright J.R. Encapsulation of platinum(II)-based

- DNA intercalators within cucurbit[6,7,8]urils // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2007 – V.12 – P.969-979.
95. Khan M.A., Ahmad N., Moin S., Mannan A. et al. Tuftsin-mediated immunoprophylaxis against an isolate of *Aspergillus fumigatus* shows less in vivo susceptibility to amphotericin B // *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* – 2005. – V.44 - P.269-276.
96. Khan A., Khan A.A., Dwivedi V., Ahmad M.G., Hakeem S., Owais M. Tuftsin augments antitumor efficacy of liposomized doxorubicin against fibrosarcoma in swiss albino mice // *Mol. Med.* – 2007. – V.13. – P.266-276.
97. Khavinson V. Kh., Lezhava T. A., Malinin V. V. Effects of Short Peptides on Lymphocyte Chromatin in Senile Subjects // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2004. - V.137 (1). - P.89-93
98. Kim K. Mechanically interlocked molecules incorporating cucurbiturils and their supramolecular assemblies. // *Chem. Soc. Rev.* – 2002. - V.31. – P.96-107.
99. Koner A.L., Nau W.M. Cucurbituril Encapsulation of Fluorescent Dyes // *Supramolecular Chemistry.* -2007. - V.19 (1-2). - P.55-66.
100. Kovalenko E. A., Mainichev D. A. Supramolecular System of Aminoacids and Cucurbit[7]uril: NMR Studies in Solution // *Applied Magnetic Resonance.* – 2015. – V. 46 (3). – P.281-293.
101. Kozlovskaya M. M., Seredenin S. B., Kozlovsky I. I., Chabak-Garbach R., Andreeva L. A., Myasoedov N. F. Selanc: the novel anxiolytic of peptide nature with the unique range of psychotropic activity // *Eur. Neuropsychopharmacol.* - 2000. - V. 10 (2). - P. 70-71.
102. Kumari A, Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* - 2010 –V.75. - P.1-18.

103. Lagona J., Mukhopadhyay P., Chacrabarti S., Isaacs L. The Cucurbit[n]uril Family // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2005 – V.44 – P.4844-4870.
104. Lee Y.C., Yalkowsky S.H. Effect of formulation on the systemic absorption of Insulin from enhancer free ocular devices // *Int. J. Pharm.* – 1999. - V.185. – P.199-204.
105. Lee J.W., Samal S., Selvapalam N., Kim H.-J., Kim K. Cucurbituril homologues and derivatives: new opportunities in supramolecular chemistry // *Acc. Chem. Res.*, 2003 - V.36. - №8. - P.621–630.
106. Lee J.W., Lee H.H., Ko Y.H., Kim K., Kim H.I. Deciphering the specific high-affinity binding of cucurbit[7]uril to amino acids in water // *J Phys Chem B.* – 2015. – V.119 (13). – P.4628-4636.
107. Liguori L., Marques B., Villegas-Mendez A. et al. Liposomes-mediated delivery of pro-apoptotic therapeutic membrane proteins. // *J. Control. Rel.* – 2008. – V.126. – P.21–27.
108. Liu W.J., Liu X.J., Li L., Li Y. et al. Tuftsin-based, EGFR-targeting fusion protein and its enediyne-energized analog show high antitumor efficacy associated with CD47 down-regulation. // *Cancer Immunol. Immunother.* - 2014. - V.63 (12) - P.1261-1272.
109. Mahapatro A., Singh D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. // *J. Nanobiotechnol.* - 2011. –V.9. – P.55.
110. Makeswar K.B., Wasankar S.R. Niosome: a Novel Drug Delivery System // *Asian J. Pharm. Res.* - 2013. - V. 3(1). - P.16-20.
111. Manning M., Chan W.Y., Sawyer W.H. Design of cyclic and linear peptide antagonists of vasopressin and oxytocin: current status and future directions. // *Regul. Pept.* – 1993. – V.45 (1-2). – P.279-283.

112. Marquez C., Hudgins R. R., Nau W. M. Mechanism of Host-Guest Complexation by Cucurbituril // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2004 - V.126 – P.5806-5816.
113. Martins S., Sarmiento B., Ferreira D.C., Souto E.B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles // *Intern. J. Nanomedic.* – 2007. - V.2. – P.595-607.
114. McInnes F.J., Arlin J.-B., Walker S., Kaeting P.E., Wheate N.J. Cucurbit[n]urils and their host- guest complexes in drug delivery // *SymPOC poster-27 Mar. 2009.*
115. McInnes F.J., Anthony N.G., Kennedy A.R., Wheate N.J. Solid state stabilisation of the orally delivered drugs atenolol, glibenclamide, memantine and paracetamol through their complexation with cucurbit[7]uril // *Org. Biomol. Chem.* – 2010. – V.8. – P.765-773.
116. Miskolczy Z., Megyesi M., Tárkányi G., Mizsei R., Biczók L. Inclusion complex formation of sanguinarine alkaloid with cucurbit[7]uril: inhibition of nucleophilic attack and photooxidation // *Org. Biomol. Chem.* – 2011. - V.9. - P.1061-1070.
117. Miskolczy Z. and Biczók L. Kinetics and Thermodynamics of Berberine Inclusion in Cucurbit[7]uril // *J. Phys. Chem. B.* – 2014. – V.118 (9). – P.2499–2505.
118. Mock W. L., Shih N.-Y. Structure and selectivity in host-guest complexes of cucurbituril // *J. Org. Chem.* - 1986 - Vol.51 - P.4440 – 4446.
119. Mok W.W., Li Y. Therapeutic peptides: new arsenal against drug resistant pathogens // *Curr. Pharm. Des.* – 2014. – V.20 (5). - P771-792.
120. Montes-Navajas P., González-Béjar M., Scaiano J.C., García H. Cucurbituril complexes cross the cell membrane. // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2009. – V.12. – P.1743-1747.

121. Morishita M., Peppas N.A. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? // *Drug Discov. Today.* - 2006. - V.11 (19-20) - P.905-910.
122. Mutchnick M.G., Appelman H.D., Chung H.T., et al. Thymosin treatment of chronic hepatitis B: a placebo-controlled pilot trial // *Hepatology.* – 1991. - V.14. - № 3. - P. 409-415.
123. Nau W.M., Ghale G., Hennig A., Bakirci H., Bailey D.M. Substrate-Selective Supramolecular Tandem Assays: Monitoring Enzyme Inhibition of Arginase and Diamine Oxidase by Fluorescent Dye Displacement from Calixarene and Cucurbituril Macrocycles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2009. - V.131. - P.11558-11570.
124. Niesner U. Quantitation of the tumor-targeting properties of antibody fragments conjugated to cell-permeating HIV-1 TAT peptides // *Bioconjug. Chem.* - 2002. – V.13. – P.729–736.
125. Nishioka K., Amoscato A.A., Babcock G.F. Tuftsin: a hormone-like tetrapeptide with antimicrobial and antitumor activities // *Life Sci.* – 1980. - V. 28. – P.1081-1090.
126. Nishioka K., Wagle J.R., Minter A.M., Rodriguez T.Jr., Dessens S.E. Tuftsin-enhanced thymidine incorporation by murine splenic monocytes // *Int. J. Immunopharmacol.*- 1990. – V.12 (8). – P.905-908.
127. Nishioka K., Dessens S.E., Rodriguez T.Jr. Stability of sterile saline solutions of synthetic tuftsin, a naturally occurring immunomodulating peptide // *Pept Res.* - 1991. - V.4 (4). - P.230-233.
128. Ollivaux C., Soye D., Toullec J.Y. Biogenesis of D-amino acid containing peptides/proteins: where, when and how? // *J Pept Sci.* – 2014. – V.8. – P.595-612.
129. Onoprienko L.V. Molecular Mechanisms of Regulation of the Macrophage Activity // *Bioorg. Khim.* -2011. – V.37 (4). – P.437-51.

130. Oun R., Floriano R.S., Isaacs L., Rowana E.G., Wheate N.J. The ex vivo neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbituril-based macrocyclic drug delivery vehicles // *Toxicol. Res.* - 2014. –V.3. - P.447-455.
131. Pandey R., Singh A.V., Pandey A., Tripathi P., Majumdar S.K., Nath L.K. Protein and peptide drugs: a brief review // *Research J. Pharm. And Tech.* – 2009. – V.2(2). – P.228-233.
132. Pandey S., Kumar B, Swamy S.M.V. A review on pharmaceutical application of cyclodextrins // *I.J.P.T.* 2010. - V. 2 (3). - P.281-319.
133. Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2012. –V.55. – P.29-47.
134. Park H.S., Lin Q., Hamilton A.D. Protein surface recognition by synthetic receptors: a route to novel submicromolar inhibitors for α -chymotrypsin // *J. Am. Chem. Soc.* – 1999. – V.121 – P.2479-2493.
135. Park S., Choi S.G., Davaa E., Park J. Encapsulation enhancement and stabilisation of insulin in cationic liposomes. // *Int. J. Pharm.* - 2011. – V.415. - P.267-272.
136. Paulesu L., DiStefano A., Luzzi E. et al. Effect of tuftsin and its retro-inverso analogue on the release of interferon ($\text{INF-}\gamma$) and tumor necrosis factor ($\text{TNF-}\alpha$) by human leucocytes // *Immunol. Lett.* – 1992. – V.34. – P. 7-11.
137. Pichierri F. DFT study of cucurbit[n]uril, $n = 5-10$. // *J. Mol. Struct. (Theochem.)* - 2006 - V.765 - P.151–152.
138. Quastler H. General principles of system analysis // *Theoretical and mathematical biology.* New York etc.: Blaisdell Publ. Co. - 1965. - P. 313-333.
139. Rafi M., Surinder M.S., Vibhu K., Anish C.K., Amulya K.P. Controlled release of bioactive recombinant human growth hormone

- from PLGA microparticles. // *J. Microencapsul.* - 2010. –V.27. – P.552–560.
140. Raja Naresh R.A., Udupa N., UmaDevi P. Effect of Macrophage Activation On Niosome Encapsulated Bleomycin In Tumor Bearing Mice// *Indian J. Of Pharmacology.* - 1996. - V. 28. - P.175-180.
141. Rajgariah P., Urbach A.R. Scope of amino acid recognition by cucurbit[8]uril // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* - 2008. - Vol.62. – P.251–254.
142. Reddy R. Controlled - release, pegylated, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs // *Ann. Pharmacol.* - 2000 – V.34. – P.915 – 923.
143. Rekharsky M.V., Yamamura H., Inoue C., Kawai M., Osaka I., Arakawa R., Shiba K., Sato A., Ko Y.H., Selvapalam N., Kim K., Inoue Y. Chiral Recognition in Cucurbituril Cavities // *J. Am. Chem. Soc.* - 2006 – V.128 – P.14871-14880.
144. Robinson E.L., Zavalij P.Y., Isaacs L. Synthesis of a Disulfonated Derivative of Cucurbit[7]uril and Investigations of its Ability to Solubilize Insoluble Drugs // *Supramol. Chem.* – 2015. – V.27. – P.288-297.
145. Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. Calixarenes in bio-medical researches // *Curr Med Chem.* – 2009. – V.16(13). – P.1630-1655.
146. Sadat T., Mirakabad F., Nejati-Koshki K., Akbarzadeh A., Yamchi M.R. et al. PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems // *Asian Pac J Cancer Prev.* - 2014. – V.15 (2). – P.517-35.
147. Saleh N., Koner A.L., Nau W.M. Activation and stabilization of drugs by supramolecular pKa shifts: Drug delivery applications tailored for cucurbiturils // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2008. – V.47. - P.5398-5401.

148. Saleh N., Al-Handawi M.B., Al-Kaabi L., Ali L., Ashraf S.S. et al. Intermolecular interactions between cucurbit[7]uril and pilocarpine // International Journal of Pharmaceutics. – 2014. -V.460. – P.53–62.
149. Sayani A.P., Chien Y.W. Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae // Crit. Rev. Ther. Drug carrier Syst. – 1996. – V.13. – P.85-184.
150. Sela M., Zisman E. Different roles of D-amino acids in immune phenomena // FASEB J. – 1997. – V.11. - P.449-456.
151. Shaji J., Patole V. Protein and peptide drug delivery: oral approaches // Indian J. Pharm. Sci. – 2008. – V.70. - №3 – P. 269-277.
152. Shakya N., Sane S.A., HaqW., Gupta S. Augmentation of antileishmanial efficacy of miltefosine in combination with tuftsin against experimental visceral leishmaniasis. //Parasitol. Res. - 2012. - V.111(2). – P.563-570.
153. Sharma G., van der Walle C.F., Ravi Kumar M.N.V. Antacid co-encapsulated polyester nanoparticles for peroral delivery of insulin: Development, pharmacokinetics, biodistribution and pharmacodynamics. // Int. J. Pharm. – 2013. – V.440. – P.99–110.
154. Shechter Y., Mironchik M., Saul A., Gershonov E. et al. New technologies to prolong life-time of peptide and protein drugs in vivo // International Journal of Peptide Research and Therapeutics –2007. - V.13 (1-2). – P.105-117.
155. Schultz I., Wurzel J., Meinel L. Drug Delivery of Insulin-like Growth Factor I. // Eur. J. Pharm. Biopharm.- 2015. - -V.97. – P.329-337.
156. Siemion I.Z., Kluczyk A. Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery. // Peptides. - 1999. - V.20(5) - P.645-74.
157. Siemion I.Z., Kluczyk A., Cebrat M. The peptide molecular links between the central nervous and the immune systems // Amino Acids. - 2005. – V.29(3).- P.161-176.

158. Smeets J.W.H., Sijbesma R.P., Niele F.J.M., Spek A.L., Smeets W.J.J., Nolte R.J.M. Novel concave building block for the synthesis of organic hosts // *J. Am. Chem. Soc.* – 1987. - Vol. 109 - P. 928-929.
159. Smith L.C., Leach D.G., Blaylock B.E., Ali O.A., Urbach A.R. Sequence-specific, nanomolar peptide binding via cucurbit[8]uril-induced folding and inclusion of neighboring side chains // *J Am Chem Soc.* – 2015. – V.137 (10). - P.3663-3669.
160. Spirer Z., Zakuth V., Golander A. et al. The effect of Tuftsin on the nitrous blue tetrazolium reduction of normal human polymorphonuclear leukocytes. // *J. Clin. Invest.* 1975. – V.55. – P.198–200.
161. Stabinsky Y., Bar-Shavit Z., Fridkin M., Goldman R. On the mechanism of action of the phagocytosis-stimulating peptide tuftsin // *Molecular and Cellular Biochemistry* April 1980. - V.30(2). - P.71-77.
162. Tan M.L., Choong P.F.M., Dass C.R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery// *Peptides* - 2010. – V.31. – P.184–193.
163. Tomin V.I., Hubisz K., Novozhilov A. V. Spectral broadening and kinetic properties of a Dapoxyl fluorescent probe // *Optics and Spectroscopy* – 2006. – V.100(5). – P.709-711.
164. Torres L.M., Peppas N.A. Transmucosal delivery systems for calcitonin: a review // *Biomaterials.* - 2000 - V.21 (12) - P. 1191-1196.
165. Tsubery H., Mironchik M., Fridkin M., and Shechter Y. Prolonging the Action of Protein and Peptide Drugs by a Novel Approach of Reversible Polyethylene Glycol Modification // *J. Biol. Chem.* - 2004. -V.279(37) – P.38118–38124.
166. Tzehoval E., Segal S., Stabinsky Y., Fridkin M. et al. Tuftsin (an Ig-associated tetrapeptide) triggers the immunogenic function of macrophages: implications for activation of programmed cells // *Proc Natl AcadSci U S A.* - 1978. – V.75 (7). – P.3400-3304.

167. Uzunova V. D., Cullinane C., Brix K., Nau W. M., Day A. I. Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo study // *Org. Biomol. Chem.* - 2010. – V.8. – P.2037–2042.
168. Verhoef J.C., Schipper N.G.M., Romeijn S.G., Merkus F.W. The potential of cyclodextrins as absorption enhancers in nasal delivery of peptide drugs // *J. Control.Release.* – 1994. – V.29. – P.351-360.
169. Vesely D.L. Family of peptides synthesized in the human body have anticancer effects. // *Anticancer Res.* – 2014. – V.34. P.1459-1466.
170. Walker S., Kaur R., McInnes F.J., Wheate N.J. Synthesis, processing and solid state excipient interactions of cucurbit[6]uril and its formulation into tablets for oral drug delivery // *Mol. Pharm.* – 2010. – V.7. – P.2166-2172.
171. Wang R., Bardelang D., Waite M., Udachin K.A., Leek D.M., Yu K., Ratcliffe C.I., Ripmesster J.A. Inclusion complexes of coumarin in cucurbiturils // *Org. Biomol. Chem.* 2009. – V.7. – P.2435-2439.
172. Wheate N.J., Buck D.P., Day A.I., Collins J.G. Cucurbit [n] uril binding of platinum anticancer complexes // *Dalton Trans.* – 2006. – P.451-458.
173. Wardowska A., Dzierzbicka K., Szaryńska M., Dabrowska-Szponar M. et al. Analogues of muramyl dipeptide (MDP) and tuftsin limit infection and inflammation in murine model of sepsis // *Vaccine.* - 2009. – V.27(3). – P.369-374.
174. Wardowska A., Dzierzbicka K., Menderska A., Trzonkowski P. New conjugates of tuftsin and muramyl dipeptide as stimulators of human monocyte-derived dendritic cells // *Protein Pept Lett.* – 2013 - V.20(2). - P.200-204.
175. Wheate N.J. Cucurbit[n]uril: A New Molecule in Host–Guest Chemistry. // *Aust. J. Chem.* - 2006. - V. 59 (5). - P. 354-356.

176. Wheate N. J. Improving platinum(II)-based anticancer drug delivery using cucurbit[n]urils // *J. Inorg. Biochem.* – 2008 – V.102. -P.2060-2063.
177. Wheate N. J., Vora V., Anthony N.G., McInnes F.J. Host–guest complexes of the antituberculosis drugs pyrazinamide and isoniazid with cucurbit[7]uril // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* – 2010. – V.68. – P.359–367.
178. Wickline S.A., Neubauer A.M., Winter P., Caruthers S., Lanza G. Applications of nanotechnology to atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – V.26. – P.435-441.
179. Wyman I.W., Macartney D.H. Cucurbit[7]uril host-guest and pseudorotaxane complexes with α,ω -bis(pyridinium)alkane dications // *Org. Biomol. Chem.* 2010. – V.8. –P.247-252.
180. Yeguas V., Altarsha M., Monard G. Peptide Binding to β -Cyclodextrins: Structure, Dynamics, Energetics, and Electronic Effects // *J. Phys. Chem. A.* - 2011. - №115. - P.11810–11817.
181. Zamyatnin A.A. Structural classification of endogenous regulatory oligopeptides // *Protein Seg. Data Anal.* - 1991. - V.4. - № 1. - P. 53-56.
182. Yi J.-M., Zhang Y.-Q., Cong H., Xue S.-F., Tao Z. Crystal structures of four host–guest inclusion complexes of $\alpha,\alpha',\delta,\delta'$ -tetramethylcucurbit[6]uril and cucurbit[8]uril with some l-amino acids // *J. Mol. Struct.* - 2009. - V.933. – P.112–117.
183. Zhang H. Characterization of cucurbituril complex ions in the gas phase using electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: PhD diss. / Zhang H. Brigham Young University, 2006. – 154 p.

184. Zhang B., Isaacs L. Acyclic cucurbit[n]uril-type molecular containers: influence of aromatic walls on their function as solubilizing excipients for insoluble drugs // *J Med Chem.* - 2014. –V.57 (22). – P.9554-9563.
185. Zhao Y., Buck D.P., Morris D.L., Pourgholami M.H., Day A.I., Collins J.G. Solubilisation and cytotoxicity of albendazole encapsulated in cucurbit[n]uril // *Org. Biomol. Chem.* - 2008. - V. 6. –P.4509-4515.