



## ОБЗОРЫ

### Инновационные лекарства и нелетальные технологии XXI века

Н.Н. Каркищенко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Прогресс в создании инновационных лекарств и их скрининг будет развиваться через оценку их влияния на серпантинные G-белки. На основе полиморфизма лиганд-рецепторной системы GPCR и расшифровки CURL (compartiment of uncooping of receptors and ligands) автором предложена концепция унитропизма. Нелетальные технологии и любые нелетальные факторы, предназначенные для воздействия на человека, должны оцениваться, валидироваться и экспертизироваться исключительно по требованиям, разрабатываемым для новых лекарств, ксенобиотиков и медицинской техники.

**Ключевые слова:** унитропизм, фармакопroteомика, фармакогеномика, защита от нелетальных воздействий.

Фармакология XXI века имеет существенные отличия от фармакологии двадцатилетней давности, так как использует другие научные дисциплины и технологии в своих поисках новых фармацевтических компонентов. Особенно это касается области развития производства и доставки лекарств, научных и технологических преимуществ в области биотехнологии и генной инженерии, геномики, протеомики, робототехники, информационных технологий и нанотехнологий, дающих возможность использовать химию и высокие технологии, которые становятся движущей силой в фармацевтических исследованиях, развитии технологий нелетальных воздействий и защиты от них.

#### Этапы создания инновационных лекарств

Жизнь подсказывает потребности в инновационных препаратах, например, когда речь идет о борьбе со смертельными болезнями, в случае, если существующие средства уже бессильны или в ситуациях, связанных с обеспечением безопасности лиц в зоне угрозы или осуществления террористического акта. Новые, аксиоматично более безопасные препараты, могут улучшить качество и защиту жизни людей. Путь от фундаментальной разработки до лекарства, вплоть до выхода его в медицинскую практику складывается из шести основных этапов.

Первый этап – замысел, длительность этого этапа подсчитать невозможно.

Второй этап – лабораторное изучение концепции лекарства, предусматривающее идентификацию, выделение или синтез потенциального вещества, на это уходит от 3-х до 5-ти лет.

Третий этап – доклинические исследования нескольких сотен или тысяч веществ, выделение лидирующего компонента с последующим определением его эффектов и тестированием в лаборатории *in vitro* и *in vivo*, в соответствии со стандартами GLP.

Четвертый, наиболее ответственный этап – клинические исследования, включающие три

фазы. *Первая фаза* первого испытания на людях, в которой участвуют от 10 до 100 здоровых и крайне редко больных людей, направлена на определение фармакокинетики и фармакодинамики нового препарата, а также на выявление побочных эффектов, возникающих при увеличении дозировки препарата. *Вторая фаза* клинических испытаний, проходящая при участии 100-300 пациентов, существует для того, чтобы получить данные с плацебо или активным препаратом сравнения об эффективности препарата по конкретным показаниям у небольшого количества больных и определить наличие краткосрочных побочных эффектов. *Третья фаза* терапевтических испытаний, в которой задействовано 1000-3000 пациентов, направлена на то, чтобы получить дополнительные данные об эффективности и безопасности препарата, необходимые для оценки преимуществ и риска, связанных с его приемом. Регистрируются НПР с частотой >1%. Все три фазы выполняются по стандартам GCP.

NB! По статистике, только три из десяти препаратов окупают расходы на их клиническую оценку. Около 1% препаратов допускают до клинического тестирования и лишь только одной молекуле из тысячи суждено обрести форму нового препарата и стать открытием.

Создав новый препарат и получив патент, то есть юридически оформленные права, защищающие новую разработку на определенный срок от создания копий и воспроизведения данного препарата, разработчик имеет относительный «иммунитет» и приоритет на уникальность препарата на данный момент времени.

Пятый и шестой этапы – государственная экспертиза и регистрация лекарственного средства, производство и рынок. Регистрация нового препарата приближает его к пациенту. В Европе документация, необходимая для подачи заявки на регистрацию препарата, состоит из 4100 папок, содержащих иногда до 1850000 страниц. Если их сложить стопкой, то получится колонна высотой 230 метров, а если разложить папки одна за другой, то их протяженность составит 550 метров. А

вслед за этим необходима отработка промышленной технологии, выпуск по требованиям GMP, лицензирование, проведение на рынок. В этом случае действуют стандарты GPP и GDP. На всех этапах есть свои «подводные камни». Но этим контроль за лекарственными средствами не завершается. Проводятся постмаркетинговые наблюдения, называемые четвертой фазой. Все это в полной мере должно относиться к поиску, изучению, оценке безопасности и использованию средств нелетального воздействия на людей и в целом к нелетальным технологиям.

### Границы нелетальных технологий и оружия

Исторически сложилось, что создание оружия и его постоянное совершенствование требует привлечение новых технологических подходов. Явления глобализации экономики с одной стороны и постоянно нарастающие локальные военные конфликты и террористические акции – с другой, повлекли за собой необходимость использования средствнейтрализации террористов, применения технологических санкций в отношении этнических, религиозных групп или государств, намеревающихся использовать оружие массового уничтожения. Это породило новые подходы к поиску средств неразрушающего или нелетального воздействия, в основу которых легли, так называемые, «нелетальные технологии», «нелетальные воздействия» или нелетальные виды оружия (НЛВО).

Термин «нелетальный» не является вполне корректным. Более подходящим термином для описания вооружения был бы «менее летальный». Конечно, оружие не может быть на 100% нелетальным. Но, понятие «нелетальный» имеет полезную характерную функцию, а критерии, лежащие в основе данного определения, устанавливают

ливают параметры, которые можно назвать нелетальным оружием. Нелетальное оружие разработано для выведения из строя людей или оборудования, с минимальным побочным эффектом для зданий и оборудования; оно не должно дискриминировать и заставлять страдать людей; эффект от его применения должен быть временным и обратимым, оно должно давать альтернативу или быть предвестием применения летального оружия.

NB! Разработка нелетального оружия должна сопровождаться созданием необходимых средств защиты, лекарств и антидотов для специальных контингентов, спасателей и невольных заложников террористов.

Многие эксперты полагают, что нелетальное оружие играет «легитимную» роль как для гражданского, так и для военного применения. Однако, существует несогласие как в оперативной эффективности применения нелетального оружия, так и в угрозе применения данного оружия с точки зрения военных конвенций и международных законов. Как обычно, баланс, может быть, достигнут там, где преимущества от развития и применения нелетального оружия перевешивают его вред. Применение нелетального оружия спорно в случаях подавления агрессивных гражданских выступлений и контроля за населением, что иногда называют «технологиями политического контроля».

К нелетальным технологиям относятся: кинетическая энергия (ударные снаряды, водяные пушки); барьеры и опутывающие сети (сети, цепи, щиты); электрическая энергия (оглушающее оружие); акустическая энергия (акустико-оптические, акустические и вихревые генераторы); направленная энергия (микроволны высокой энергии, миллиметровые волны, лазеры низкой и высокой энергии); химическая энергия (кальмативы, инкапсуланты, раздражающие химические

Таблица 1.

### Спектр химико-биологического оружия [28]

Классические образцы химического оружия	Промышленные фармацевтические химические вещества	Биорегуляторы, Пептиды	Токсины	Генетически модифицированные агенты	Традиционные агенты
Цианиды	Аэрозоли	Субстанция Р	Сакситоксин	Модифицированные/хвостатые (tailored) бактерии и вирусы	Бактерии
Фосген	Кальмативы	Нейрокинин А	Рицин		Вирусы (оспа)
Горчичный газ	Инкаласитанты		Токсины ботулинуза		Риккетсии
Нервно-паралитический газ					Сибирская язва
					Чума
					Туляремия

Конвенция использования химического оружия

Конвенция использования

биологического и токсического оружия

Яды

Инфицирование

Средства, малодорантны, антитракционные материалы, обскуранты, пены, химические средства против средств передвижения и других материальных средств, дефолианты, гербициды).

Токсические химические или биохимические агенты, воздействующие на нейрорецепторы центральной нервной системы, вызывающие седативный эффект, дезориентацию, галлюцинации, изменения настроения, бессознательное состояние и смерть применяются в виде аэрозолей (различные RCAs, т.е. агенты контроля за беспорядком – Riot Control Agents). Бактерии, разрушающие различные материалы (например, пластик, металлы и др.), а также фунгициды для уничтожения наркосодержащих культур (опиума или коки), оцениваются как и химические средства, *неправомочными для применения* в отношении людей агентами. Wheelis назвал эти субстанции потенциальным биохимическим оружием [28]. Большинство исследований в области нелетального оружия не имели глубокой научной основы, зачастую отражая сами себя, хотя и являясь объективными и контролируемыми. Часто бывает трудно экстраполировать точно, какие тесты были использованы для оценки нелетальной технологии, а какие, квалифицированно говоря, для измерения найденного эффекта в виде оружейных воздействий.

### **Terra incognita – между лекарством и нелетальным воздействием**

Многие продукты, являющиеся результатом биотехнологической революции, влияют на процессы жизнедеятельности различных уровней через химические компоненты. Все химические составляющие, которые имеют токсические свойства, попадают под конвенцию использования химического оружия (табл.1). Проблема неконтролируемого использования химических средств XXI века группами, имеющими террористическую мотивацию, заключается в том, что новые токсические биохимические компоненты высокоефективны при применении на уровне низких доз и могут развиваться и использоваться как химическое оружие.

В существующем прогрессе знаний о функционировании геномов продвигается понимание фундаментальных процессов жизни на молекулярном уровне. Ясно, что все эти исследования позволяют лучше понять зарождение болезней на генетическом уровне в соответствии с трактовкой, лечением этих болезней или созданием средств защиты от нелетальных воздействий. Однако, применение во время кризиса в московском театре «нокаутирующего газа» (по американской версии “knock-out gas”, а по нашей – один из аналогов 3-метилфентанила) является сильным напоминанием того, что лекарства с совершенно легитимным медицинским применением могут быть использованы для различных целей, как в данном случае аналоги фентанила. Использование его находилось под наблюдением руководящих лиц,

однако наличие НЛВО внутри террористических групп привносит возможность несанкционированного использования средств с непредсказуемыми последствиями.

Биомедицина вместе с науками о жизни влияет на разработку как лекарств, так и средств нелетальных воздействий. В настоящее время, наибольший потенциал имеют разработки для пульмонологии, т.е. ингаляционных средств для проникновения вглубь легких. Чтобы лекарства были эффективны, необходимо создавать частицы лекарств или капель в интервале 1–5 микрон. Это точно соответствует размеру, которого пытались достичь при создании агентов боевых химических и биологических веществ, что делает еще более ясным *двойной аспект* использования новых открытий в этой области. Потенциал несанкционированного использования связан с применением наночастиц, которые могли быть использованы для повышения восприимчивости легочной ткани или мозга к агентам нелетальных воздействий или быть непосредственной специфической целевой мишенью в теле человека для блокировки защитных механизмов.

Подобно аспекту контроля нелетального использования биологических агентов, научно-техническое развитие движется вперед в таких областях как фармакология, неврология, иммунология. Разрыв между технологиями, с помощью которых должен осуществляться мониторинг, контрлинг и реальный контроль, создает исключительную актуальность проблеме поиска новых моделей оценки нелетальных воздействий, в особенности в целях их разграничений с нелетальным и реальным биологическим и химическим оружием. Это же является крайне актуальным и при создании инновационных лекарств.

NB! Пока факторы нелетального воздействия не будут созданы и валидированы также как лекарственные препараты и средства медицинского назначения, прогресс в этом направлении будет активно смещаться в сторону средств летального поражения. Это логика, вытекающая из анализа истории вооружений, в которой нет альтернатив.

Можно с полной ответственностью заявить, что разработки НЛВО идут опережающими темпами и в значительном отрыве от исследования последствий использования нелетальных технологий. Воздействие нелетальных технологий и продуктов их использования на человека изучено крайне мало. Необходимы специальные методы оценки и средства измерения, а также адекватные животные и альтернативные модели.

### **Через унитропность рецепторов к спектру эффектов**

Представления о рецепторных механизмах регуляции жизнедеятельности организма и влияния на них лекарств, ксенобиотиков, разнообразных биологически активных веществ и нелетальных воздействий претерпевают в начале XXI века

огромную трансформацию. Открытия все новых и новых рецепторов подобны перенасыщенному раствору, неизменно переходящему в стадию рекристаллизации. Анализ существующих представлений о фармако- и токсикодинамике веществ, механизмах их действия логично аппроксимируется в синтез и консолидацию новых представлений фармакогеномики [26].

**NB!** Фармакогеномика – это развитие постгеномных технологий в фармакологии, изучение распространённости генетического межвидового и внутривидового полиморфизма, генотипирования ферментов метаболизма лекарств и иных процессов, объясняющих индивидуальные различия эффектов лекарственного лечения.

Различия фармакогенетики от фармакогеномики заключается в том, что первая изучает общие особенности генетической детерминированности действия лекарств, а вторая – их эффекты у индивидуумов.

Будущее фармакогеномики заключается в использовании в клинической практике молекулярных методов, ориентированных на индивидуальный подбор лекарственного препарата и его дозы для пациента. Преимуществом фармакогеномного подхода к выбору лекарственной терапии является *однократность определения генотипа* пациента. Генотип не изменяется в течение всей жизни, если не считать редких соматических мутаций. Методы генотипирования совершаются столь быстро, что скоро будет возможным тестирование тысячи нуклеотидных замен в одном анализе. Тестирование на введение лекарственного вещества, например, по 20000 однонуклеотидных полиморфизмов в 5000 генах, возможно уже в недалеком будущем. Генотипирование возможно интерпретировать в соответствии с диагнозом и корректно использовать для выбора как фармакотерапии так и защиты от нелетальных воздействий.

На каждом этапе развития науки возникают новые и совершенно «неожиданные» концепции и взгляды, которые при более внимательном рассмотрении выглядят как хорошо забытые старые. Теория *биохимических трансформаций* Нидхэма приводит к выводу о существовании «общего химического плана», свойственного всем организмам и о возможности преобразовать одну биохимическую систему в другую с помощью определенных пространственно-временных трансформаций. Исследования большого и широкого семейства генов в царстве грибов, растений и животных, привело к открытию серпантинных белков [23].

**NB!** Внешняя часть каждого витка серпантина является антенной для молекулярных сигналов, входящих в клетку, а внутренние части – тригером на отклик клетки на эти сигналы, начиная с активации сигнального процессора, называемого G-протеин (G-protein). Сами серпантинами таким образом известны как G-протеин, связанный с рецепторами (G-protein coupled receptor или GPCR).

Все GPCR рецепторы обладают сходной структурой. Каждый из них представляет собой интегральный белок, который имеет наружную или внеклеточную, внутреннюю или внутриклеточную части и семь трансмембранных доменов. Гены, кодирующие эти белки, состоят из двух экзонов и одного интрона, разделяющего кодирующую последовательность на участке, соответствующем второй внутриклеточной петле белка. Было установлено, что при экспрессии генов GPCR рецепторов имеет место альтернативный спlicing, благодаря чему образуется несколько транскриптов этих генов.

Это привело к делению общей структуры на 7 трансмембранных сегментов, с минимальной последовательностью подобия среди наиболее удаленных GPCR. В то же время, семейство белков GPCR в геноме человека более чем представительно (около 900 членов), а рецепторы и лиганды играют роль в большинстве аспектов физиологии, фармакологии и имеют отношение к большому числу заболеваний (в ряду примерно 200 GPCR) через изучение его роли в геноме, лиганде, рецепторе. Примерно 1700 GPCR и несвязанных мембранных протеинов в качестве контроля разделены на 34 кластера. Этот подход позволил идентифицировать в системе GPCR рецепторы для аминов, пириддинов, пуринов, цептидов, VIP, секретинов, цАМФ, мелатонина, серотонина, родопсина, ГАМК, глюкозы и т.д. Для нас наиболее интересна идентификация рецепторов для пириддинов, на чем мы остановимся далее.

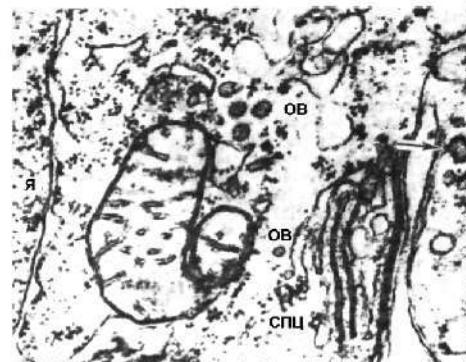


Рис.1. Появление многочисленных окаймленных везикул (OB) в цитоплазме нейрона и субповерхностных цистерн (СПЦ) у плазмолеммы.

В правой части рисунка – формирование крупной окаймленной везикулы (стрелка). Ув. 65000.

Бурное развитие исследований трансмембранных белков GPCR, мембранных белков и ионных каналов, поринов, транспортеров и т.д., заставило оглянуться и вспомнить представления о явлениях унитропизма лекарств и ксенобиотиков. В середине восьмидесятых годов с помощью электронно-микроскопических исследований нам уда-

лось подтвердить наличие **единых механизмов действия психотропных средств** на уровне лиганд-рецепторов. Эти работы [24, 25] легли в общую концепцию унитропизма и стали основой создания новых лекарств, онко- и иммунотоксиконов. Название унитропизма происходит от *uni* –

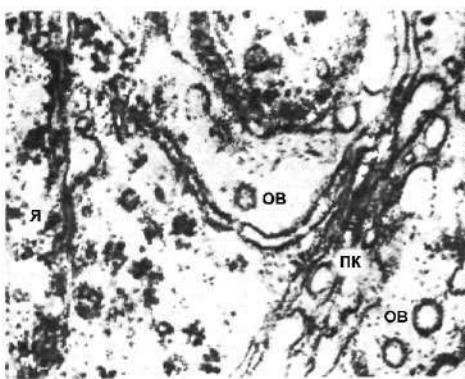


Рис.2. Появление большого числа окаймленных везикул (ОВ) в зоне пластинчатого комплекса (ПК). Ув. 68000.

единий, *tropos* – направление, средство.

Клеточная мембрана нейронов служит материалом для окаймленных везикул (рис.1), поэтому в условиях массового образования их при действии психотропных препаратов, как нами было показано, создается своего рода дефицит поверхности клетки или «минус-мембрана».

Другой причиной возникновения «минус-мембран» является формирование в цитоплазме

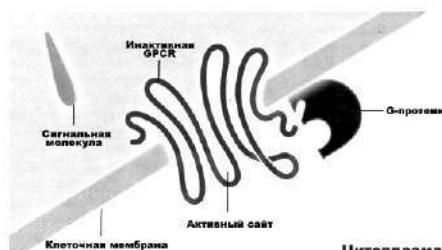


Рис.3. GPCR, семь раз пересекает клеточную мембрану, что является типичным результатом блокировки сообщения в клетку пока сигнальная молекула (гормон, нейромедиатор и т.д.) не обволакивает область, называемую активной зоной (сайтом).

нервных клеток и их отростках миелиноподобных структур, на построение которых также расходуется материал плазмолеммы и мембран различных органелл клетки (рис.2). Хотя этот дефицит частично восполняется благодаря существованию своеобразного конвейера и рециклированию интернализованных мембран, тем не менее требуется какие-то дополнительные механизмы, ком-

пенсирующие их убыль.

По нашему мнению, образование пакетов гладких мембранных везикул в цитоплазме, последующая дислокация их к поверхности клетки и дальнейшее встраивание молекул фосфолипидов в плазмолемму и составляют основу восстановительного процесса, осуществляющегося с помощью субповерхностных цистерн.

В опытах с двойной меткой в клетках частицами золота исходного размера при инкубации срезов сначала с антителами против лиганда (гликопротеин с терминалной галактозой), а затем с антителами против соответствующего рецептора оказалось возможным идентифицировать везикулярно-тубулярную систему, получившую название CURL (от англ.compartment of uncooping of receptor and ligands, т.е. место разделения рецептора и лиганда). По-видимому, именно там происходят диссоциация рецептора и лиганда, а также их перераспределение, в результате чего лиганды сосредотачиваются в везикулярной части CURL, а



Рис.4. Лиганд-рецепторное «обволакивание» является причиной активации молекулы, называемой G-протеином, которая переключает серию внутримолекулярных взаимодействий. Кульминацией же является изменение поведения клетки.

рецепторы – в тубулярном отделе.

Когда в середине 90-х годов ХХ века были установлены уникальные свойства серпантиновых белков клеточных мембран, оказалось что, наряду со специфическими рецепторами, с ними взаимодействует огромное количество лекарств, по меньшей мере, более половины из известных сейчас (рис.3).

Новые взгляды на функционирование GPCR предполагают появление новых подходов к лечению болезней. Трансмембранные белки представляют собой одну из самых больших групп белков, выполняющих сигнальную, транспортную, защитную, рецепторную, метаболическую и структурную функции (рис.4).

*Похожесть рецепторов*, находящихся на поверхности клетки, дала концепцию новых целей для разработки инновационных лекарств для лечения самых различных заболеваний. На молекулярном уровне эти лекарства воздействуют

на один серпантинный белок, который семь раз проходит через мембрану, клетки (рис.5).

Современные исследования подтверждают, что маленькие молекулы, вовлеченные в эти



Рис.5. GPCR, семь раз пересекает клеточную мембрану, что является типичным результатом блокировки сообщения в клетку пока сигнальная молекула (гормон, нейромедиатор и т.д.) не обволакивает область, называемую активной зоной (сайтом).

дополнительные области сайтов, могли бы быть управляемыми для активации или перевода в спокойное состояние GPCR.

### Эффекты GPCR и проведение сигнала

Несмотря на полиморфность структуры GPCR унитропностью к ним обладает великое множество «узкоспециализированных» существующих и, надо думать, будущих лекарств. Через GPCR действуют различные лекарства, которые понижают давление, снижают выделение кислоты в желудке, бронходилататоры, антидепрессанты и многие другие, воздействующие на эти рецепторы средства. В качестве примера можно наугад выбрать препараты: Albuterol, Cetirizine, Famotidine, Fentanyl, Fexofenadine, Methyluracil, Metoprolol, Montelukast, Olanzapine, Oxycodone, Paracetamol, Pomephazine, Pseudoephedrine, Ranitidine, Salmeterol, Sumatriptan, Tamsulosin, Uterplex, применимые соответственно как бронхолитики, антиспастики, противовоз阵енные, нейролептоаналгетики, противоаллергические, регенераторные, антигипертензивные, противовоспалительные, антипсихотические, обезболивающие, антидепрессивные, антигистаминные, кровоостанавливающие, противовоз阵енные, антиастматические, antimigrainозные, противоопухолевые, антиульцерогенные средства. Следует подчер-

кнуть, что каждый из названных здесь препаратов обладает и другими свойствами, например, производные пиридидинов утеплекс и метилурацил, наряду с reparativными свойствами обладают психотропными эффектами [24]. Все зависимости от химической структуры и фармакологических эффектов все они действуют через систему GPCR [23].

Многсторонность системы GPCR значительно превосходит любой другой класс поверхностно-клеточных рецепторов. Природные молекулы, на которые есть отклик GPCR, имеют размер от нейротрансмиттеров, которые только в несколько раз больше атома углерода, до протеинов, которые в 75 раз больше него. GPCR участвует во всех функциях организма, которые поддерживают жизнь, от биения сердца и пищеварения до дыхания и активности мозга.

Наиболее хорошо изученными рецепторами системы GPCR оказались аденоэпиновые рецепторы A1 и A2. Первоначально их классифицировали на основе воздействия на аденилатциклизазу. Рецептор A1 является ее ингибитором, а рецепторы A2 – стимуляторами. В действительности, рецепторы A1 и A2 взаимодействуют с различными G-белками: рецептор A1 – с  $G_{\alpha_i}$ -белком, а рецептор A2 – с  $G_s$ -белком. Рецептор A3 также взаимодействует с  $G_{\alpha_i}$ -белком. Кроме того, имеются данные, что все аденоэпиновые рецепторы могут взаимодействовать с другими G-белками.

После активации G-белков активируются определенные ферменты и ионные каналы. С участием рецептора A1 осуществляется инициирование аденилатциклизазы, активация некоторых типов калиевых каналов, инактивация N-, P- и Q-типов кальциевых каналов, активация фосфолипазы С $\beta$  и т.п. Сходным образом действует и рецептор A3. Рецепторы A2A и A2B стимулируют образование цАМФ, но другая их активность, в частности мобилизация внутриклеточного кальция, также была описана. Воздействие рецептора A2A на нейтрофильные лейкоциты отчасти обусловлено цАМФ, но цАМФ-независимые эффекты, связанные с активностью рецепторов A2A также можно предположить.

### Агонисты и антагонисты GPCR

Лекарства, воздействующие на GPCR, работают либо как классические агонисты, т.е. воздействуют на область «антенный» в рецепторе (также известную как активная область) и имитируют эффект природного нейротрансмиттера, гормона или другой молекулы, которая обычно посыпает сигналы через GPCR, либо как антагонисты т.с. служат помехой способности самого организма воздействовать на антиген (рис.6). За последние 15 лет технологическая революция предоставила исследователям с новым мышлением возможность увидеть GPCR в работе. Последовательно появились другие способы манипулирования активностью GPCR и они положили начало разра-

ботке новых лекарств. Несмотря на богатство медицинских средств, ожидается много открытий и интересных вещей впереди. Исследование при-



Рис.6. Если молекулы действуют вне клетки, активная зона может также влиять на активность GPCR. Препараты, которые действуют на GPCR обычно воздействуют на активную зону и или имитируют действие природной сигнальной молекулы (см. рис. 5), или препятствуют природным сигналам вследствие блока рецептора, и, таким образом, их воздействию на клетку.

ицициально новых фармацевтических средств находится на ранних стадиях, но некоторые агенты, включая средства лечения опухолей и ВИЧ-инфекций, уже в настоящее время развиваются через испытания на человеке.

За длительное время исследований было выявлено много химических соединений, которые являются агонистами и антагонистами GPCR системы. Для аденоzinового рецептора A1 у человека, крысы и мыши в качестве основного синтетического агониста выступает N6-цикlopентиладеноzin (CPA) и его производные, а в качестве антагониста 1,3-дипропил-8-цикlopентилксантин (DPCPX) [11, 12, 13].

Другой интересный класс соединений, взаимодействующий с рецептором A1, представляет собой так называемые аллюстериические энхансеры (рис.7). Вещества этого класса повышают способность агонистов связываться с рецепторами и усиливают эффект от их действия. К числу этих соединений относится (2-амино-4,5-диметил-3-тиенил)-[3-(трифлуорометил)-фенил]-метанон (PD81723) и его производные [5, 8, 10].

В качестве селективного агониста рецептора A2 долгое время рассматривалось вещество 5'-N-этилкарбоксамидаденоzin (NECA), но за последнее время было получено производное этого вещества, обладающее большей селективностью

– 2-[p-(2-карбонил-этил)-фенилглиамино]-5'-N-этилкарбоксамидаденоzin (CGS21680). Однако у человека это вещество действует на рецептор A2 менее эффективно и менее избирательно, чем у крысы. Дополнительная проблема, связанная с CGS21680 как с инструментом для скрининга, заключается в том, что это вещество имеет свойство связываться с другими рецепторами, никак не связанными с рецепторами аденоzinса [2].

Недавно был получен новый агонист рецептора A2A, который более чем в 50 раз превосходит CGS21680 по эффективности – 4-[3-[6-амино-9-(5-этилкарбамоил-3,4-дигидрокси-тетрагидрофuran-2-ил)-9Н-пурин-2-ил]-пропо-2-инил]-метиловый эфир циклогексанкарбоксиловой кислоты (ATL146e). Также рецептор A2A имеет несколько антагонистов. Среди них наиболее важные 5-амино-2-(2-фурил)-7-фенилэтил-пиразоло[4,3-е]-1,2,3-тразоло[1,5-с]пирамидин (SCH58261) и 4-(2-[7-амино-2[2-фурил]-[1,2,4]триазоло[2,3-а]{1,3,5}тразин-5-ил-амино]этил)фенол (ZM241385) [4, 14, 17].

Аденоzinовый рецептор A2B обладает низким сродством к большинству агонистов, и селективность этих агонистов также незначительна. В случае антагонистов дело обстоит лучше – были обнаружены эффективные и относительно избирательные антагонисты [3].

Открытый самым последним, аденоzinовый

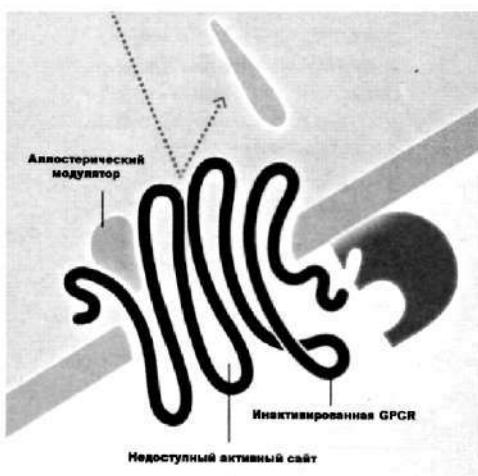


Рис.7. Аллюстериические модуляторы модифицируют действие фармакологических агентов и стабилизируют сопряжение GPCR на пути, который увеличивает или усиливает активность рецепторов, обеспечивающих недоступность активной области для подачи сигнала молекуле.

рецептор A3 является нечувствительным к некоторым ксантикам, поэтому антагонисты этого рецептора обладают нексантиновой структурой, включая дигидропиридины, пиридины и флаваноиды [5]. Производные изохинолина и хинозолина

образуют другой класс высокоспецифичных антагонистов рецептора A3 человека. VUF8504 (4-метокси-N-[2-(2-пиридинил)хинозолин-4-ил]бензамид) был первым представителем этого класса. Позднее был открыт VUF5574 (N-(2-метоксифенил)-N-(2-(3-пиридилил)хинозолин-4-ил)мочевина) – вещество более эффективное чем VUF8504. Одним из наиболее селективных антагонистов рецептора A3 человека является MRE-3008-F20-5 – [[(4-метоксифенил)амино] карбонил]амино-8-этил-2-(2-фурил)-пиразоло[4,3-e]1,2,4-триазол [1,5-с]пириимидин.

### Межвидовые лиганд-рецепторные различия

Клинико-генетические наблюдения различий лекарственного воздействия впервые опубликованы в 1950-х годах. Они дали толчок к развитию *фармакогенетики*, а позднее *фармакогеномики*. Фармакогенетика изучает общие особенности генетической детерминированности действия лекарств, а фармакогеномика объясняет индивидуальные различия эффекта лекарственного лечения. На данный период идентифицировано более 1,4 миллионов однокодонных полиморфизмов в геноме человека. Более 60 000 находятся в кодирующих последовательностях генов, а некоторые из них ассоциированы с метаболизмом лекарств и ксенобиотиков и используются как тест-маркеры реакций организма. Эффекты лекарств представляют собой зачастую взаимодействие нескольких генных продуктов, которые влияют на их фармакокинетику и фармакодинамику. Особое внимание сфокусировано на особенностях терапевтического лечения, обусловленного наследственными различиями. Клинические примеры использования знаний, накопленных фармакогеномикой для определения прогноза лекарственной терапии с помощью молекулярных методов обследования пациента активно биомоделируются на животных.

Межвидовые различия в сродстве лигандов наиболее значительны для лигандов рецептора A3. Как правило, сродство одних и тех же антагонистов к рецепторам A3 человека примерно в 100 раз выше, чем к рецепторам крысы. Были обнаружены также межвидовые различия в сродстве лигандов к своим рецепторам. В особенности это относится к антагонистам. Так например, 8-фенилксантинны избирательны в отношении рецепторов A1 у крысы и менее избирательны у человека. Это снижение избирательности связано с тем, что у человека 8-фенилксантинны обладают сродством не только к A1, но и к A2A рецепторам.

Фармакологическая роль рецепторов системы GPCR изучалась на биомоделях генетически модифицированных нокаутных мышах [26]. Первым геном, подвергнутым нокауту, был ген рецептора A2A. Изучение таких мышей показало, что рецептор A2A играет роль в проведении болевого сигнала через периферические участки, ингибировании

агрегации тромбоцитов и регуляции кровяного давления. Рецептор A2A также важен для моторной стимуляции эффектов кофеина. Также было показано, что рецептор A2A вносит свой вклад в ишемические повреждения мозга у взрослых мышей [9].

Мыши с инактивацией рецепторов A3 в тканях показали снижение влияния аналогов аденоцина на дегрануляцию тучных клеток, что вызывало снижение проницаемости сосудов. Также эти животные неожиданно продемонстрировали увеличение кардиоваскулярных эффектов при введении им аденоцина.

Инактивирование рецепторов A1 вызвало повышенное чувство тревоги, кроме того эти мыши становились гипераллергиками. Показано участие рецептора A1 в проведении сигнала эндогенной антиоцидации. У этих животных влияние аденоцина на возбудительную нейротрансмиссию было полностью элиминировано [15, 16, 18], а нейрональный ответ на гипоксию был также значительно изменен. Кроме того, у этих животных отсутствовала тубулогломерулярная петля обратной связи и был повышен уровень ренина [7]. Интересно, что все эти животные имели нормальную жизнеспособность и fertильность.

До последних лет преобладало мнение, что для влияния на активность GPCR лекарства должны воздействовать на активную область рецепторов, поскольку при нормальном функционировании организма нейротрансмиттеры и другие информационные молекулы – лиганды играют роль «ключей» для «запирания» на внешней поверхности активной области (рис. 7).

**NB!** Лианцы, которые входят в «замок» могли бы, как любые другие ключи привнести нежелательные ингибиторные сигналы через рецепторы, тогда как лекарство, которое имитирует природные лиганды, могло бы открыть замок и таким образом сыграть роль утерянного природного ключа.

Вызвать селективный физиологический отклик могли бы вещества, которые способны взаимодействовать со специфической формой рецепторов, но игнорировать другие варианты. Нейротрансмиттеры норадреналин и адреналин, например, активизируют два вида GPCR, называемых  $\alpha$  и  $\beta$  адренорецепторы, из которых первый имеет четыре подтипа ( $\alpha_1$ - $\alpha_4$ ), а второй – три ( $\beta_1$ - $\beta_3$ ). Эти различные рецепторы, при возврате, руководят различными процессами поддержания жизни. В сердце  $\beta_1$  адренорецептор участвует в сердцебиение и увеличивает силу в каждой доле; в легких  $\beta_2$  адренорецепторы расширяют воздушные каналы. Следовательно, для открывания сократившихся воздушных путей без нежелательных побочных эффектов на сердце, фармакологи могут создать агент, который имитирует способность норадреналина стимулировать  $\beta_2$  адренорецептор, но без эффекта стимулирования  $\beta_1$  адренорецептора [20].

**NB!** Лекарства работают как ингибиторы или

агонисты, моделируя имитаторы взаимодействия с активной областью специфической GPCR. Новая стратегия развития лекарств будет иметь дело с «аллостерической» природой GPCR, т.е. форма одной части рецептора может влиять на согласованность и, таким образом, на активность удаленных частей единой рецепторной системы (рис. 7).

Действительно, конформационные способности позволяют GPCR постоянно адаптировать различные её формы, существенно сопоставляя с «блоком памяти». В этом случае естественные сигнальные молекулы воздействуют на активную область и активируют G-протеины. В дальнейшем, по принципу обратной связи, активные молекулы, известные как аллостерические модуляторы, могут перешлесться в другом месте для влияния на его форму и активность (рис. 7). «Стабилизированные» GPCR повышают способность передавать сигналы, тогда как «корректирующие» формы, которые прячут подобно разведчикам-нелегалам активную область так, чтобы она стала недоступной для этих природных лигандов, препятствуют этому.

Существуют большие перспективы терапевтической модификации функции GPCR. Теоретически рецепторы могут влиять на оплетенные области в любом случае, в котором маленькая молекула может стабилизировать форму, которая является результатом добротного биологического эффекта.

Активно исследуются потенциальные аллостерические модуляторы, которые способны блокировать ВИЧ-воздбудителей из инфицированных клеток. Вирусы атакуют клетки Т-хелперы путем прилипания к поверхности белка, называемого CD4. Этот белок никогда не действует в одиночку. Для попадания в клетку вирус оплетает дополнительный якорь GPCR, известный как CCR5 или, на более поздних стадиях инфицирования, называемый CXCR4. Обычно CCR5 откликается на любой из трех хемокинов, природные сигналы которых могут притягивать клетки иммунной системы к области инфекции, но к несчастью для ВИЧ-инфицированных пациентов этот якорь является мощным крючком для протеина, покрывающего вирус (gp120). Но нет худа без добра, ибо CCR5 теперь появляется на научном поле, чтобы быть центральным игроком в расшифровке ВИЧ-инфекции и птичьего гриппа H5N1. Становится понятным, что апокалиптические прогнозы некоторых ученых, предрекающие гибель человечества от СПИДа или вируса H5N1, к счастью не оправдываются, а его снижение предопределено возрастанием числа людей, которые генетически маскируют «якоря» CCR5 и CXCR4, создавая предпосылки причин для их недостатка в функциональных формах GPCR в отношении вирусных белков gp120 и других. Аллостерические модуляторы, которые поддерживают CCR5 в формах неблагоприятных к оплетанию gp120 из ВИЧ уже изучаются на людях. Блокировка взаимодействия

gp120–CCR5 путем доставки этих крошечных лекарств является достижением, сравнимым с подвигом Давида, победившего Голиафа.

### **Дуальность и унитропность системы GPCR**

Эффект, производимый GPCR, зависит не только от внеклеточных молекул, которые оплетают их, но также от того, сколько копий рецепторов доступно на поверхности клетки. Когда внеклеточные сигналы переплетают многие копии рецепторов, клетка получает более «громкое» сообщение и подвергается большим поведенческим изменениям, чем в случае, когда включено только несколько единичных копий рецепторов. Но возрастание количества активных рецепторов может дать больше, чем просто контролинг «объема». Оно может действительно влиять на некоторые виды G-протеинов, стимулируя их, и, таким образом, руководя активацией различных каскадов молекулярных взаимодействий внутри клетки, обеспечивая процессы *унитропности* к лигандам.

G-протеины приходят в четырех главных формах, с подтипами в каждом классе. Каждый имеет свою склонность к работе с любым заданным GPCR, и для его части GPCR может не быть равной активности сумме всех G-протеинов. Скудный запас данных рецепторов может быть, таким образом, результатом активации только наиболее чувствительного G-протеина, тогда как изобилие может руководить откликом множества G-протеинов, извлекающих различное клеточное поведение.

NB! GPCR может более не рассматриваться как простой тумблер или «+»-«-»- переключатель на гормональном или нейротрансмиттерном уровне или выключатель, когда природный сигнал уходит из оплетенной области. Он является гораздо более сложной информационно-процессорной единицей механизмов унитропизма.

Теоретически, различные варианты откликов, генерируемые GPCR, будут зависеть как от ряда лигандов, которые можно определить, так и от смеси видов G-протеинов, которые можно активировать. Как пример можно привести отклик GPCR на тиротропин-гормон гипофиза, который вырабатывается щитовидной железой. Если, например, рецептор может определить три любых сигнала и может активировать любой из них, или даже все четыре главных G-протеина, то такой рецептор выигрывает теоретическую способность запуска *сотен форм поведения*, в тот или иной момент времени. Если бы это был только двухполюсный переключатель, он имел бы только два положения для включения или выключения лишь одной формы реакции.

Разные субстанции могут раздражать рецепторы для поддержания различных биологически активных форм, каждая из которых может взаимодействовать с различными G-протеинами или комбинациями G-протеинов, переключая активность

расходящихся внутриклеточных путей.

**NB!** Агенты, которые могут вызывать увеличение или уменьшение количества рецепторов на поверхности клетки, должны быть признаны наиболее ценными в формировании механизмов унитропизма.

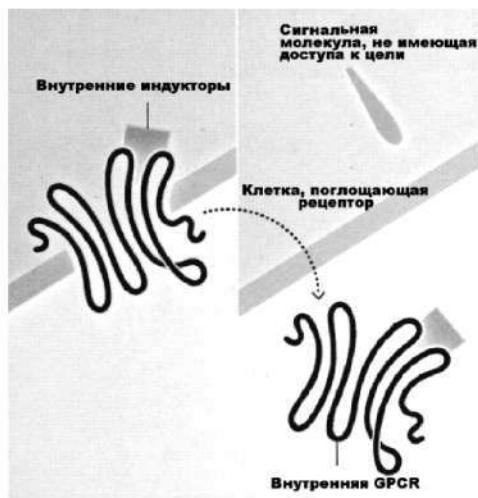


Рис. 8. Целью внутренних индукторов и инверсных агонистов является «конституционная» активизация GPCR. Такие рецепторы имеют «неправильное» поведение, как если бы они направлялись стимуляторами, даже когда их нет (вверху). Прикрепление инверсного агониста приводит к переводу сигнала в спокойное состояние (внизу).

лизма, а принципиально новые лекарства или нелетальные факторы обладают преимуществами этой комплексности в воздействии на рецепторы.

Эта последняя стратегия могла бы преследовать цель поражения ВИЧ. Одна проблема, которая может возникнуть из доверия аллостерическим модуляторам и внутренним индукторам (рис.8), это то, что вирус быстро мутирует, а проблема возникает при повреждении вирусного покрытия белка из находящихся в его введенных областях на CCR5. Способность к мутации может привести к созданию покрытия белка, которое должно быть близким родственником к аллостерическим ранним CCR5. Благовидным предлогом для предотвращения этой угрозы должна быть блокада механизмов унитропизма и изгнание «блудного сына» рецептора с поверхности клетки, и, таким образом, устранение точки вирусной атаки.

Подобно всем другим GPCR, CCR5 синтезируется бесконечно клеткой, расположенной на поверхности и затем входит внутрь для деградации или переработки, а окончательный хемокинез обеспечивает CCR5 интернализацию (рис.9). Этот путь повышает возможность нахождения фармакологических агентов, которые не только должны ускорять перемещение CCR5 с поверхности клетки, но также вступать в качестве протектора, к которому нелетальный биологический объект или

вирус не смогут адаптироваться. После всего этого возбудитель лишается возможности блокады входа в CCR5 с поверхности клетки.

Безикулярный фрагмент CURL с лигандом оказывается объектом агрессии лизосом и встроенных в них ферментов, а тубулярный участок, нагруженный рецепторами, *ампутируется от системы CURL*, и, таким образом, рецепторы, избежав протеолиза, возвращаются на поверхность клетки.

GPCR будучи за пределами контроля аллостерических модуляторов, может представить другое биологически важное поведение, известное как основная деятельность (*constitutive activity*). Суть его в том, что они могут активировать G-протеины, даже без вовлечения пограничных лигандов. Действительно, в других изоформах

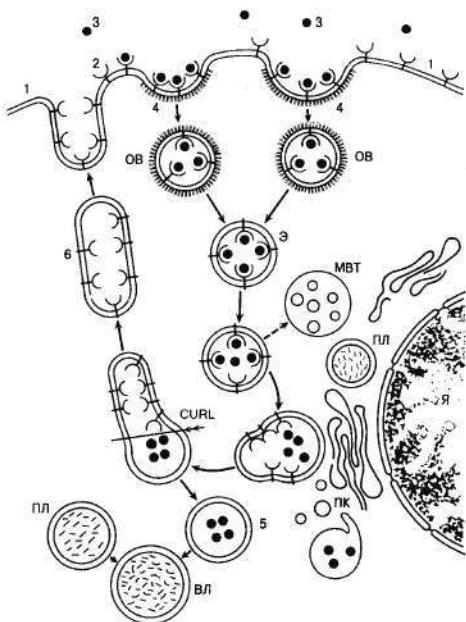


Рис. 9. Схема взаимодействия лиганда и рецептора.  
1 – плазмолемма нейрона; 2 – receptor; 3 – лиганд;  
4 – окаймленное углубление; 5 – везикулярная часть системы CURL; 6 – тубулярная часть системы CURL.  
*Сплошная стрелка* – альтернативный путь взаимодействия лиганда с участком мультивезикулярного тельца (МВТ); *двойная стрелка* – место разделения на везикулярную и тубулярную части в системе CURL. ОВ – окаймленные везикулы; Э – ядро; ПЛ – первичная лизосома; ВЛ – вторичная лизосома; ПК – пластинчатый комплекс; CURL – место разделения рецептора и лиганда; Э – эндосома.

функционирование GPCR превращается из существующей формы в вид, характерный для рецепторов. Их структура, однако, должна быть такой, какую рецепторы принимают крайне редко. При нормальных условиях количество молекул, которые адаптируются, будет исчезающе мало и

они будут оказывать незначительный эффект на поведение клеток, а также трудно дифференцируемы и определимы. Но, если рецепторы *существенно активны*, их совместные сигналы могут оказаться весьма значительными и достаточными для запуска соответствующих процессов и реакций, как в собственной, так и в иных рецепторных системах.

GPCR-система может осуществлять свою функцию во взаимодействии с многими рецепторными системами. Получен ряд доказательств, свидетельствующих о важных взаимодействиях между аденоzinовыми рецепторами A1, рецепторами дофамина D1 и N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторами в мозгу. *Во-первых*, активация NMDA-рецепторов способна увеличивать высвобождение аденоцина. *Во-вторых*, известно, что аденоцин может снижать высвобождение глутамата путем активации пресинаптических рецепторов, и посредством этого уменьшать активность NMDA-рецепторов. Вдобавок активация аденоцинового рецептора A1 уменьшает поступление NMDA путем постсинаптического действия. *В-третьих*, NMDA-рецепторы и рецепторы дофамина D1 синергически оказывают влияние на экспрессию ранних генов в мозгу [6], а некоторые долгосрочные эффекты от активации дофаминовых рецепторов D1 могут быть блокированы NMDA-рецепторами по механизму антагонизма. Но существует и антагонистическое взаимодействие между дофаминовыми рецепторами D1 и аденоциновыми рецепторами A1. Все эти взаимодействия функционально взаимосвязаны и активация дофаминовых рецепторов D1 уменьшает высвобождение глутамата путем стимуляции активности NMDA-рецепторов. Это приводит к высвобождению аденоцина, который в свою очередь взаимодействует с пресинаптическими рецепторами A1.

Аденоциновые рецепторы A2A в большом количестве содержатся в базальных ганглиях некоторых видов, включая человека. Там они особенно сконцентрированы в ГАМК-эргических выводных нейронах. Эти нейроны также экспрессируют дофаминовые рецепторы D2. Было показано, что эти два типа рецепторов взаимодействуют между собой [21]. Было установлено, что главная роль дофамина в клетках стриатума заключается в подавлении проведения сигнала через рецепторы A2A [9].

Аденоциновые рецепторы A2B представлены во многих клетках, и было неоднократно показано, что проведение сигнала через эти рецепторы связано с проведением сигнала через другие рецепторы, воздействующие на PLC-Ca<sup>2+</sup>-протеинкиназы C, и эта связь осуществляется по типу конкурирования [1]. Существует также множество других примеров взаимодействия между GPCR и рецепторами других классов. *Синергизм / антагонизм* присущ GPCR не только в отношении дофаминовой системы. Он дает нам ключ к созда-

нию инновационных лекарств и истинно нелетальных технологий.

NB! Этот, казалось бы, внутренне противоречивый, но вполне естественный входной билет в будущее, выдан нам матушкой Природой. Причем, на одной его стороне написано «унитропность», а на другой «дуплексность».

*Дуальность* фундаментальных природных процессов хорошо отображаются в деятельности системы GPCR. Так, наряду с осуществлением жизненно важных механизмов, через GPCR могут запускаться и патологические процессы. Это особенно наглядно при таких болезнях, как вирусная инфекция или рак, которые могут преимущественно индуцировать один или несколько *рецепторов-триггеров* болезни. Так, например, через рецептор для гормона, называемого вазоактивным интестинальным пептидом (VIP) может запускаться рак поджелудочной железы. В нормальной панкреатидной клетке, которую отображает этот GPCR, активация рецептора VIP'ом приводит к делению клеток, но у человека больного раком, рецептор становится избыточным и производит это действие бесконечно, без необходимости для VIP-стимуляции (рис.10). Возникают предпосылки для монционной пролиферации клеток опухоли. Онкологи наблюдали подобные явления с разрушающей деятельностью в определенных нене-GPCR рецепторах, называемых расами.



Рис. 10. Генетически модифицированные агенты нелетальных воздействий, как и раковые клетки, являются инверсными агонистами и зачастую имеют большое число конституционально активных рецепторов, которые теоретически могли бы привести к бесконтрольному делению клетки.

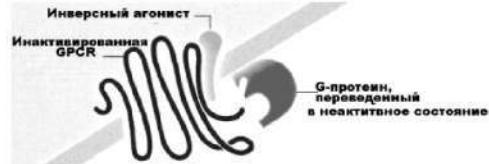


Рис. 11. Позитивным моментом является то, что инверсные агонисты могли бы потенциально стать новой стратегией создания средств для лечения рака и антагонистами (антидотами) нелетальных воздействий биологического происхождения.

Существующие противоопухолевые средства не способны подавить клеточные механизмы инвертированного переключения конституционально активных рецепторов. Агонисты рецептора должны были бы «подсказать» рецепторам как

поддерживать активную форму, антагонисты должны были бы предупредить природный сигнал из активного рецептора, однако такие агенты не действуют на рецепторы, которым не требуются внешние воздействия для развития эффекта.

**NB!** Требуются принципиально новые лекарства, которые воздействуют на структуру активной GPCR для поддержания её неактивной формы, преобразуя её в «худящем режиме».

Такие агенты, называемые *инверсными агонистами*, помогут создать новую важную стратегию противораковой терапии (рис.11). Они также могут применяться при лечении ожирения. В этой области, можно предвидеть цели, включая новые типы рецепторов, например, подтипа H3 рецептора гистамина в качестве регулятора аппетита через мозговые регуляторные системы. В целом же – это путь создания инновационных фармакопротекторов, в том числе и средств защиты от нелетальных воздействий.

### Фармакопротеомика – как базис новых лекарств

Выяснение роли белковых веществ и конструкций в механизмах действия и развитии многогранных эффектов лекарств изучались давно. Но лишь к XXI веку эти исследования оформились в виде биомедицинского научного направления, получившего название *фармакопротеомика*. Белок, как правило, выполняет одну узкоспециализированную функцию и лишь в отдельных случаях – несколько взаимосвязанных.



Рис. 12. Лекарства, ксенобиотики и многие факторы нелетальных воздействий взаимодействуют со всем разнообразием белковых молекул.

На рис. 12 показана в самом общем виде сфера неполного множества белков, с которым с различной степенью заинтересованности взаимодействуют лекарства, ксенобиотики и факторы нелетальных воздействий. Эта сфера столь обширна, что, мы уже говорили, понадобилось выделить ее в самостоятельное научное направление – фармакопротеомику.

**NB!** Фармакопротеомика является научным направлением исследования новых потенциальных биомишеней лекарств, изучения интимных механизмов их действия, включая лиганд – рецепторные отношения, конструирования и оценки эффектов инновационных веществ-лекарств и спе-

циальных средств защиты.

Фармакопротеомика неразрывно связана с *фармакогеномикой*. Это продуктивно и взаимооплодотворяюще развивающиеся области *инновационной фармакологии*. В качестве примера системного биомоделирования можно привести последние данные о том, как четыре аденоzinовых рецептора из подмножества GPCR было клонированы и охарактеризованы у различных видов млекопитающих. Эти рецепторы получили название A1, A2A, A2B и A3 в соответствии с принципами номенклатуры рецепторов, принятой NC-IUPHAR. Согласно этих рекомендаций название рецептору дается по названию главного эндогенного агониста. Рецепторы A2A и A2B взаимодействуют главным образом с Gs-белком, а рецепторы A1 и A3 с Gi<sub>o</sub>-белком, однако взаимодействия с другими G-белками также были отмечены. Аденоzin является главным эндогенным агонистом всех четырех рецепторов, но инозин может также активировать рецептор A3. Уровень аденоцина, наблюдаемый в нормальных условиях, является достаточным, для того чтобы вызвать активацию всех четырех рецепторов и обеспечить взаимодействие с ними огромного количества лекарственных средств.

Оценка 900 GPCR генов человека показала, что около 420 из них могут быть *биомедицинским пространством* действия рецепторов и целью воздействия лекарств. Несомненно, что фармакологи сфокусируют свои усилия на развитии известных ингибиторов или агонистов, действуя в области GPCR рецепторов. По-видимому, это займет 15 или 20 лет для разработки первых групп инновационных лекарств, изучения их действия, оценки безопасности и выведения на рынок. Но это сформирует новые взгляды на то, как контролировать действие GPCR. И если концепция обретет не только методологические, но чисто методические, практические оболочки, то прогресс в направленном конструировании лекарств станет продуктивным и стремительным.

Предпосылкой этому является то, что некоторые формы поведения GPCR идеальны для биомоделирования, конструирования и создания лекарств. Мембранные G-протеины формируют комплексы, которые функционируют как рецепторы, имеющие чувствительность, которой нет у отдельных компонент. Эти комплексы участвуют в регуляции активности клетки и имеют способность откликаться на сигнал, который в других ситуациях они игнорировали. Индивидуальные протеины имеют свои программы в специфических генах, но эти комбинации рецепторов не всегда соответствуют простым программам поведения, на основе которых это поведение могло быть предсказано. Поэтому они должны быть рассмотрены как продукт «фантома» генов.

Через систему GPCR аденоzin защищает ткани сердца и мозга от ишемических повреждений благодаря множеству субрецепторов. Активация

рецепторов A1 и, возможно, A3 осуществляет профилактическую защиту сердца и других тканей от последующих ишемических повреждений. Аденозин также вызывает ингибирование пролиферации клеток лимфомы и является хемопротективным агентом, и это связано с активностью рецепторов A1 и A3. Агонисты рецепторов A2A защищают ткани от повреждения путем уменьшения воспаления, возникающего во время кровоизлияний при ишемических повреждениях. Сходная кардиопротективная роль приписывается и рецептору A3.

Локализация рецепторов A2A в областях стриатума и черной субстанции мозга, богатых дофамином, наводит на мысль о том, что антагонисты этого рецептора могут быть использованы в качестве адьюванта дофаминергических лекарств при лечении болезни Паркинсона и шизофрении.

Как известно, IgE антитела и тучные клетки играют центральную роль в патогенезе астмы. В тучных клетках присутствуют аденоzinовые рецепторы A2B и A3, которые, будучи активированными, облегчают антигенобусловленную дегрануляцию тучных клеток. Использование неселективного антагониста аденоzinовых рецепторов теофиллина широко применяется при лечении астмы, хотя механизм его действия на систему GPCR до конца не ясен.

Несмотря на большие успехи ученых, пока сравнительно мало лигандов GPCR используется в клинической практике. Собственно аденоzin используют в некоторых странах для восстановления нормального сердечного ритма при тахикардии и в качестве вспомогательного средства при оценке степени поражения коронарной артерии на модели талиевоой интоксикации. В семидесятые годы метаболически стабильные агонисты аденоzinовых рецепторов были протестиированы как антигипертензивные средства, а в девяностых годах N-[(1S,транс)-2-гидроксицикlopентил] аденоzin был проверен на добровольцах, как адьювант при терапии диабета второго типа. Другие вещества пока ждут своей очереди. Таким образом, рецепторы GPCR системы остаются притягательным «фармакопротеомным» объектом для открытия новых лекарственных средств.

Существенно важно, что *новые рецепторы* являются комплексной составляющей из двух или более GPCR. В других случаях, они содержат GPCR и ко-протеин – не являющийся рецептором, но дающий рецептору предыдущий набор свойств. Например, рецептор для гормона, называемого амилином, похож на этот тип. Амилин модулирует воздействие на инсулин панкреатических и других клеток, но попытки идентифицировать простой протеин, который сохраняется, как рецептор, потерпели неудачу. Анализ настоящих полных последовательностей генома человека показал, что *для такого рецептора нет гена*.

Однако, комплекс существующих GPCR для гормона щитовидной железы, включающий каль-

цитонин плюс нерецепторный протеин и называемый RAMP (receptor activity-modifying protein) откликается на амилин сильно и избирательно. Вероямо, RAMP делает рецептор кальцитонин «многозычным» – поэтому рецептор отзыается на кальцитонин, даже если клетки не содержат RAMP, но тем более он чувствителен к амилину, если клетки содержат RAMP. Другой ко-протеин, называемый RCP (receptor component protein), воздействует на рецептор кальцитонин в соответствии с сигналом из другой субстанции – CGRP (calcium-gene-related peptide), маленький белок, который наиболее известен как расширяющий кровеносные сосуды. Это особенно заметно во время беременности, когда уровень RCP и пептидов повышается в крови и плаценте. С повышением концентрации RCP повышается количество рецепторов кальцитонинов. Они становятся чувствительны к явлению дилатации сосудов, что усиливает запас крови в тканях плода.

Так как ко-протеины влияют на активность GPCR, они могут сами обеспечивать изменения цели для лекарств. Одной из интригующих целей является модулин, ко-протеин, который обволакивает рецепторы серотонина. В мозгу серотонин участвует в нейротрансмиссии. Прозак и соответствующие антидепрессанты повышают уровни серотонина в мозге. Вне мозга он действует на кишечник и кровеносные сосуды. Неудивительно, что рецепторы серотонина имеют множество подтипов, и модулин в дальнейшем настраивает влияние серотонина на определенные клетки через иные подтипы чувствительности к нему. Лекарства, которые имитируют или ингибируют модулин, теоретически могут повысить или понизить отклик специфических рецепторов серотонина на специфические типы клеток и стать перспективными в различных областях медицины: от лечения шизофрении до регуляции желудочно-кишечных функций.

### **Взгляд в будущее скрининга лекарств**

Различные животные и люди по-разному реагируют на введение одного и того же лекарственного вещества. Эффекты лекарств зависят от их химической природы и взаимодействия между собой, возраста, функционального состояния органов, сопутствующей терапии. Вклад генетических факторов в вариабельность реакции составляет от 20 до 95%. Различия ответа на лекарства обусловлены вариантами нуклеотидной последовательности генов, кодирующих ферменты метаболизма лекарств, молекулы-переносчики лекарств и рецепторы, взаимодействующие с лекарствами. Наследственная же детерминированность ответа остается постоянной на протяжении всей жизни индивида, как в человеческом обществе, так и в животном мире.

Существенный вклад в эти процессы вкладывают и транспортные белки, в особенности P-гликопротеин, кодируемый геном человека

АВСВ1 или MDR1. В гематоэнцефалическом барьере мозга Р-гликопротеин ограничивает аккумуляцию многих лекарств, включая дигоксин, ивермештин, винбластин, дексаметазон, циклоспорин, домперидон, лоперамид. С вариабельной экспресс-

–оротовой кислоты и [<sup>3</sup>Н] – уридина [24].

Эндогенные пиримидины обладают значительным сходством по химической структуре с молекулами некоторых психотропных препаратов [24]. В то же время для уридина и оротовой кисло-

Таблица 2.

**Влияние концентрации немеченого уридина на связывание мембранными неокортекса [<sup>3</sup>Н]-уридина (концентрация [<sup>3</sup>Н]-уридина 71нМ/л, Т 40 С)**

Lg <sub>c</sub> немеченого уридина	Количество связанного [ <sup>3</sup> Н]-уридина, фпМ на 1 нг белка
3,00	0,27±0,01
4,00	0,27±0,02
5,00	0,44±0,05
6,00	0,46±0,01
7,0	0,54±0,02

Таблица 3.

**Концентрация и связывание [<sup>3</sup>Н]-уридина с белками мозга**

Концентрация [ <sup>3</sup> Н]-уридина	Связывание, фпМ на 1 нг белка		
	суммарное	неспецифическое	специфическое
24	0,42 ±0,01	0,33 ±0,01	0,01 ±0,02
36	0,77 ±0,03	0,61 ±0,03	0,16 ±0,06
47	1,07 ±0,01	0,72 ±0,04	0,35 ±0,05
71	1,40 ±0,05	1,08 ±0,06	0,32 ±0,11
121	2,53 ±0,13	1,92 ±0,09	0,61 ±0,22
355	6,01 ±0,41	4,97 ±0,25	1,05 ±0,47

сивностью Р-гликопротеина в двенадцатиперстной кишке ассоциирован синонимичный *однонуклеотидный полиморфизм*, т.е. полиморфизм, который не меняет аминокислоту, в экзоне 26 (3435С→Т). Высокая биопригодность другого субстрата Р-гликопротеина – дигоксина обнаружена у субъектов с генотипом 3435TT.

Однонуклеотидный полиморфизм связан с явлениями фармакокинетических вариаций, как в отдельных клетках крови, так и в целом организме. Вне всякого сомнения эти синонимические процессы тесным образом сопряжены с системами G-белков, в ряду которых выделены 8 семейств (классы A, B, C, D, E, орфаны) идентифицированных по GPCR и около десятка предполагаемых. В классе A, наряду с родопсином и мелатонином находятся и нуклеотиды, а в классе C – глутамат и ГАМК-В. Поскольку более детальное обозначение семейства GPCR звучит как *гуанин - нуклеотид - обволакивающие парапротеиновые рецепторы*, а роль нуклеотидов и, в частности, пиримидинов, вряд ли теперь требует дополнительных доказательств. Приведем собственные данные в качестве альтернативной модели лиганд-рецепторных механизмов взаимодействия психотропных средств по связыванию с мембранными нервных клеток [14H]

ты, являющихся пиримидиновыми производными, выявлены анксиолитическая, антидепрессивная и другие виды психотропной активности. Для выяснения механизма психотропного действия этих веществ нами проведены эксперименты, целью которых явилось выяснение способности оротата калия и уридина взаимодействовать с рецепторными участками мембран нервной ткани. Эксперименты проводились на крысах с применением радиоизотопных методов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что [<sup>14</sup>H]-оротовая кислота не связывается с мембранными нервной ткани. Противоположные данные были получены для [<sup>3</sup>H]-уридина, который обладал не только неспецифическим, но и *специфическим связыванием с мембранными*. Определение неспецифического связывания [<sup>3</sup>H]-уридина проводили путем инкубации его с суспензией мембран в присутствии 10-310-4, 10-5, 10-6 и 10-7 М и немеченого уридина [24]. При концентрации немеченого уридина 0,1 ммоль/л и выше специфическое связывание было полностью ингибирировано и оставалось лишь неспецифическое связывание (табл. 2).

Обнаружено, что специфическое связывание не зависит от повышения температуры с 4 до 37°C. В то же время неспецифическое связывание

увеличивалось в 4 раза и за счет этого суммарное связывание возрастало на 159%. Кроме того, выявлено, что специфическое связывание [<sup>3</sup>H]-уридина достаточно слабое по сравнению с неспецифическим. Специфическое связывание увеличивается с ростом концентрации [<sup>3</sup>H]-уридина (табл. 3).

Изучение конкурентных взаимоотношений за места специфического связывания [<sup>3</sup>H]-уридином группы психотропных препаратов показало, что диазепам, коразол и пирацетам проявили тенденцию к вытеснению уридина с рецепторами. Медазепам, галоперидол и мелипрамин достоверно снижали специфическое связывание [<sup>3</sup>H]-уридина соответственно на 65, 61 и 82%. В присутствии NaCl вытеснение уридина бензодиазепиновыми транквилизаторами повышалось, что объясняется (если принять во внимание гипотезу о связывании уридина с бензодиазепиновыми рецепторами) возрастанием сродства бензодиазепинов к их рецепторам в присутствии хлорида натрия [22]. Наибольшая активность вытеснения уридина со специфических мест связывания была характерна для пентобарбитала [24], что согласуется с данными литературы, свидетельствующими о большом сходстве пиримидинов с барбитуратами. О барбитуратах же известно, что они взаимодействуют с комплексом ГАМК-бензодиазепины – барбитуратные рецепторы [27]. Кокаин и фенибути не изменяли специфического связывания [<sup>3</sup>H]-уридина. Таким же действием обладали и инозин, синтетическое производное пиримидина, условно названное РП-72. Последнее соединение при введении животным оказывало выраженное транквилизирующее действие. Тот факт, что инозин, связывающийся с бензодиазепиновыми рецепторами, и РП-72 не влияли на связывание уридина с мембранными, можно объяснить взаимодействием этих веществ и уридина с разными подтипами рецепторов бензодиазепинов. Хлорид натрия недостоверно повышал связывание уридина, при использовании ГАМК и галлюциногена МДФ было характерно достоверное усиление способности уридина связываться с мембранными (соответственно на 51 и 67%).

На рис. 13 представлены результаты сравнительного изучения влияния ряда психотропных препаратов на связывание уридина с его рецепторами. Видно, что некоторые из этих препаратов способны вытеснять [<sup>3</sup>H]-уридин из его специфических мест связывания, т.е. обладают сродством к этому рецептору. Наибольшая активность вытеснения была характерна для пентобарбитала. Меньшей способностью вытеснять уридин обладали мелипрамин (82%), коразол (70%), медазепам (65%) и галоперидол (61%). Пирацетам, кокайн и инозин не обнаруживали статистически достоверного влияния на связывание уридина. Из представленных материалов следует, что большинство психотропных препаратов, несмотря на их принадлежность к различным классам, взаимодействуют с одним рецептором, лигандом которого является уридин.

Известно, что в присутствии ГАМК и NaCl усиливается специфическое связывание большинство лигандов бензодиазепиновых рецепторов

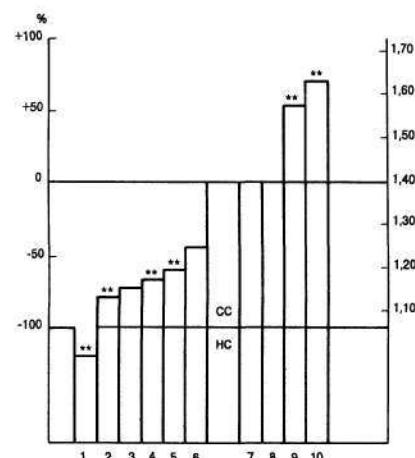


Рис. 13. Влияние веществ на связывание [<sup>3</sup>H]-уридина с мембранными неокортекса крыс. СС и НС – соответственно специфическое связывание (0,33 дрМ на 1 нг белка). 1 – пентобарбитал; 2 – мелипрамин; 3 – коразол; 4 – медазепам; 5 – галоперидол; 6 – пирацетам; 7 – кокайн; 8 – инозин; 9 – ГАМК; 10 – МДФ. Все вещества применяли в концентрации 10<sup>4</sup> М/л\*\* Достоверное различие ( $p<0,05$ ). По ординате справа – связывание, дрМ на 1 нг белка

[19]. Следовательно, выявленный нами факт подтверждает, что уридин является эндогенным лигандом бензодиазепиновых рецепторов. Из представленных материалов следует, что многие психотропные препараты, несмотря на их принадлежность к различным классам могут взаимодействовать с местами специфического связывания уридина. Общим видом воздействия обладают представители таких классов психотропных средств, как барбитураты, транквилизаторы, антидепрессанты, нейролептики и ноотропы. К перечисленной группе можно отнести ГАМК, с рецепторами которой взаимодействует уридин. Можно делать вывод, что уридин взаимодействует со всеми компонентами комплекса ГАМК-бензодиазепины-барбитуратный рецептор. Наличие у уридина специфических мест связывания с бензодиазепинами, так же как и с мелипрамином, позволяет отчасти вскрыть молекулярный механизм как анксиолитического, так и антидепрессивного компонентов в спектре психотропной активности уридина, выявленного нами. Во многом аналогичный спектр действия оротата калия осуществляется при его введении, по-видимому, за счет синтеза из оротовой кислоты уридина, который действует на уровне рецепторов трансмембранных белков.

По-видимому, в дальнейшем будет предложе-

но немало новых моделей для скрининга принципиально инновационных лекарств через рецепторику системы GPCR. Но приведенная здесь модель была отработана нами в 80-х годах прошлого столетия и стала базой для направленного синтеза, изучения и последующего предложения для медицинского применения таких препаратов как триметидон, бромпиридин, йодипиридимин и другие. Важно то, что эта модель позволила выявить, наряду с регенерирующими, лейкопротективными и фагостимулирующими свойствами, значительные психотропные эффекты, которые вместе, вне всякого сомнения, реализуются через GPCR систему.

Технологическая революция в биомедицине несет с собой огромное количество новых данных, касающихся как геномов, так и новых химических компонентов, которые являются производными этих средств, свойства и потенциал которых могут быть рассмотрены и как новые лекарства. В соответствии с консервативной оценкой, более чем 1 млн. таких компонентов ежегодно изучается только в США, 50000 которых впоследствии исключаются из использования из-за их токсических свойств. Развитие в этой области имеет быстрый прогресс также и в связи с тем, что время на разработку лекарства постоянно снижается, поэтому были разработаны новые информационные системы, названные Матрицей лекарств (Drug-Matrix). Эта система содержит 2000 ссылок на лекарства и «модели новых вероятных существенных биологических, токсических и клинических эффектов». Очевиден потенциал несанкционированного использования системы, которая позволяет идентифицировать новые химические компоненты в соответствии с их токсичностью. При детальном анализе алгоритма обработки данных, возрастают потенциал для идентификации специфических эффектов химических компонентов и их применения либо в виде нелетальных технологий, либо в виде лекарств.

NB! Нелетальные технологии и любые нелетальные факторы, предназначенные для воздействия на человека, должны оцениваться, валидироваться и экспертизироваться исключительно по требованиям, разрабатываемым для новых лекарств, ксенобиотиков и медицинской техники. Только тогда это будут именно нелетальные технологии, а не ширма, прикрывающая разработки опасных для жизни человека факторов воздействия, под названием «нелетальное оружие».

Это еще раз подтверждает дуальность науки, плоды которой могут использоваться во благо и во вред для людей. Интересы человека, как гласит Хельсинская декларация, всегда должны ставиться выше интересов науки и общества.

### Литература

- Altio N., Balmform A.J., Fredholm B.B. – Adenosine A1 receptor-induced cAMP changes in d384 astrocytoma cells and the effect of bradikinin thereon. // *Acta Physiol Scand* 144, p. 55-63, 1992.
- Altio N., Fredholm B.B. – Bradykinin inhibition of cyclic AMP accumulation in d384 astrocytoma cells. Evidence against a role of cyclic GMP. // *Neurochem Int* 21, p. 209-213, 1992.
- Auchampach J.A., Gross G.J. – Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. // *Am J Physiol* 264, p. H1327-H1336.
- Baraldi P.G., Cacciari B., Merighi S., Varani K., Borea P.A., Spalluto G. – A(3) adenosine receptor ligands: history and perspectives. // *Med. Res Rev* 20, p. 103-128, 2000.
- Baraldi P.G., Zaid A.N., Lampronti I., Fruttarolo F., Pavani M.G., Tabrizi M.A., Shryock J.C., Leung E., Romagnoli R. Synthesis and biological effects of a new series of 2-amino-3-benzoylthiophenes as allosteric enhancers of A1-adenosine receptor. // *Bioorg Med Chem Lett* 10, p. 1953-1957, 2000.
- Berretta S., Robertson H.A., Graybiel A.M. Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of Fos-like protein in the striatum. // *J Neurophysiol* 68, p. 767-777, 2004.
- Brown R., Ollerstam A., Johansson B., Skott O., Gerbe-Medhin S., Persson A.E. Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma rennin in adenosine A1 receptor-deficient mice. // *Am J Physiol* 281, p. R1362-R1367, 2006.
- Bruns R.F., Fegrus J.H. Allosteric enhancement of adenosine A1 receptor binding and function by 2-amino-3-benzoylthiophenes. // *Mol Pharmacol* 38, p. 939-949, 1990.
- Chen J.F., Moratalla R., Impagnatiello F., Grandy D.K., Cuellar B., Rubinstein M., Beilstein M.A., Hackett E., Fink J.S., Low M.J., Ongini E., Schwarzschild M.A. The role of the D2 dopamine receptor (D2R) in A2A adenosine receptor (A2AR)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A2A and D2 receptor knockout mice. // *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, p. 1970-1975, 2001.
- Cronstein B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. // *J Appl Physiol*, 76, p. 5-13, 1994.
- Cunha R.A., Dunwiddie T.V., Constantino M.D., Sebastiao A.M., Fredholm B.B. Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A2A receptor agonist [3H] CGS 21680 in the rat hippocampus and different from striatal A2A receptors. // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 353, p. 261-271, 1996.
- de Mendonca A., Ribeiro J.A. Adenosine inhibits the NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic potential in the hippocampus. // *Brain Res* 606: p. 351-356, 1993.
- de Mendonca A., Sebastian A.M., Ribeiro J.A. Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurons by adenosine A1 receptor activation. // *Neuroreport* 6, p. 1097-1100, 2003.
- Deckert J., Gleiter C.H. Adenosine-an endogenous neuroprotective metabolite and

- neuromodulator. // *J Neural Transm Suppl* 43, p.32-31, 1994.
15. *Delaney S.M., Geiger J.D.* Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism. // *J Pharmacol Exp Ther* 285, p.568-572, 1998.
  16. *Delaney S.M., Shepel P.N., Geiger J.D.* Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals. // *J. Pharmacol Exp Ther* 285, p. 561-567, 2002.
  17. *Dunwiddia T.V., Fredholm B.B.* Adenosine neuromodulation, in Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics (Jacobson KA and Jarvis MF eds) pp. 359-382, 1997.
  18. *Dunwiddia T.V., Masino S.A., Poelchen W., Diao L., Johansson B., Fredholm B.B.* Altered electrophysiological sensitivity to A1 but not GABA $\beta$  agonists in the hippocampal CA1 region in adenosine A1 receptor knockout mice. // *Society for Neuroscience* 26, p.816-818, 2000.
  19. *Ellert F.J., Roeske W.R., Braestrup C. et al.* *Europ. J. Pharm.* Vol. 70, №4, p 593-596, 1981.
  20. *Ferre S., Popoli P., Gimenez-Llort L., Finnman U.B., Matrinez E., Scotti de Carolis A., Fuxe K.* – Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. // *Neuroreport* 6, p. 73-76, 1994.
  21. *Ferre S., Torvinen M., Antoniou K., Irenius E., Givelli O., Arenas E., Fredholm B.B., Fuxe K.* – Adenosine A1 receptor mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably contrastfected fibroblast cells. // *J Biol. Chem* 273, p.4718-4724, 1998.
  22. *Fujimoto M., Hirai K., Okabayashi T.* *Life Sci.* Vol. 30, № 1, p.51-57, 1982.
  23. *Kenakin T.A.* Pharmacology Primer: Theory, Application, and Methods. Academic Press [Elsevier], 2003.
  24. *Каркищенко Н.Н.* Психоунитропизм лекарственных средств. – М.: Медицина, 1993. – 208 с.
  25. *Каркищенко Н.Н., Соловьев В.В., Бардахчян Э.А.* // Изв. СКНИЦ ВШИ. Естеств. науки. – 1988. – № 1. – С.121-125.
  26. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2004.
  27. *Valdes F., Fenelli R.L., NcNamara J.O.* *Life Sci.* Vol.29, № 18, p.1895-1900, 1981.

### **Innovation drugs and non-lethal technologies in XXI century**

**N.N.Karkischenko**

*Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** unitropism, pharmacoproteomics, pharmacogenomics, non-lethal weapons protection.

The progress in creation of innovation drugs and theirs screening will develop through the estimation of theirs influence on serpentine G-proteins. On the basis of ligand-receptors system polymorphism GPCR and decoding of CURL (compartment of uncoeping of receptors and ligands) the author offers conception of unitropism. Non-lethal technologies and any non-lethal factors for humans must evaluate, validate and gone through expertise with requirements for new drugs, xenobiotics and medical equipment.