

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-75-81

УДК: 616.341-006.6-092.4:615.277.3.015.44

Для цитирования: Трещалина Е.М., Черкасова Ж.Р., Андропова Н.В., Лукашева Е.В., Бабаева Г., Клинский Е.Ю., Трещалин М.И., Цуркан С.А. Моделирование интернализации водорастворимых противоопухолевых цитостатиков в тонкой кишке экспресс-методом *ex vivo* с помощью хемилюминесценции. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18(6): 75–81. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-75-81.

For citation: Treshalina H.M., Tcherkassova J.R., Andronova N.V., Lukasheva E.V., Babayeva G., Kliniski E. Yu., Treshchalin M.I., Tsurkan S.A. Modeling of *ex vivo* internalization method of water-soluble anticancer drugs in small intestine using chemiluminescence. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18(6): 75–81. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-6-75-81.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЦИТОСТАТИКОВ В ТОНКОЙ КИШКЕ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ EX VIVO С ПОМОЩЬЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Е.М. Трещалина¹, Ж.Р. Черкасова², Н.В. Андропова¹, Е.В. Лукашева³,
Г.Бабаева³, Е.Ю. Клинский², М.И.Трещалин⁴, С.А. Цуркан²

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, г. Москва, Россия. E-mail: treshalina@yandex.ru¹

Россия, г. Москва, 115548, Каширское шоссе, 24¹

ООО «Джейвис Диагностикс», г. Москва, Россия²

Россия, г. Москва, 143026, ИЦ Сколково, Б. Бульвар, 42²

Российский Университет Дружбы народов (РУДН), г. Москва, Россия³

Россия, г. Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, 6³

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»,
г. Москва, Россия⁴

Россия, г. Москва, 119021, ул. Б. Пироговская, 11⁴

Аннотация

Введение. Способность к всасыванию в тонкой кишке (интернализация) водорастворимых противоопухолевых цитостатиков определяет возможность их перорального применения. Экспресс-метод *ex vivo*, моделирующий интернализацию веществ в рамках модифицированной методики изолированного «вывернутого» отрезка тонкой кишки крысы с импульсной хемилюминесценцией, адекватен для решения поставленной задачи. **Цель исследования** – оценка всасывания в организм из тонкой кишки новых водорастворимых противоопухолевых цитостатиков с различными свойствами для доклинического изучения при пероральном введении. **Материал и методы.** В исследование включены конъюгированные с Акридином (*Acridinium NHS Ester, Toronto Research Chemicals, Canada*) цитостатики: низкомолекулярный (1) Антрафуран-Акридин (MW 0,8 кДа) и высокомолекулярные (2) Аимпила-Акридин (MW 105 кДа) и (3) L-лизин- α -оксидаза (ЛО-Акридин, MW 122 кДа). Всасывание определено в модифицированной модели изолированного «вывернутого» отрезка тонкой кишки крысы методом импульсной флэш-хемилюминесценции и пересчитано в процентах. **Результаты.** Показано, что в зависимости от молярной концентрации от 2500 (1) до 9,2–188 нмоль/л (2, 3) уровень всасывания конъюгированных с Акридином цитостатиков находится в диапазоне от 55 % (1) до 1,7–11 % (2, 3) соответственно. Уровень всасывания конъюгированного Антрафурана (55 %) согласуется с величиной известной эффективной пероральной дозы неконъюгированного цитостатика, которая была в два раза больше, чем эквивалентная парентеральная доза: 100 мг/кг против 50 мг/кг. **Заключение.** Полученные данные позволяют рассматривать экспресс-метод *ex vivo* для скрининга возможности доклинического изучения различных водорастворимых противоопухолевых цитостатиков при пероральном введении с прогнозированием стартовой дозы. Метод адекватен тестам *in vivo* и экономически целесообразен в силу быстрого ответа и малого количества тестируемого агента.

Ключевые слова: цитостатики, интернализация, тонкая кишка, экспресс-метод, *ex vivo*.

MODELING OF EX VIVO INTERNALIZATION METHOD OF WATER-SOLUBLE ANTICANCER DRUGS IN SMALL INTESTINE USING CHEMILUMINESCENCE

H.M. Treshalina¹, J.R. Tcherkassova², N.V. Andronova¹, E.V. Lukasheva³, G. Babayeva³, E.Yu. Klinski², M.I. Treshchalin⁴, S.A. Tsurkan²

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: treshalina@yandex.ru¹

24, Kashirskoye shosse, 115548-Moscow, Russia¹

«JVS Diagnostics LLC», Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia²

B. Boulevard 42, 143026-Moscow, Russia²

Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia³

6, Miklukho-Maklaya Street, 117198-Moscow, Russia³

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia⁴

11, Pirogovskaya Street, 119021-Moscow, Russia⁴

Abstract

Introduction. The ability of the small intestine (internalization) to absorb water-soluble anticancer cytostatics determines the possibility of their oral administration. The ex-vivo express method that simulates the internalization of substances using a modified technique of an isolated «inverted» segment of the rat small intestine with flash chemiluminescence is adequate to solve the problem. **Objectives:** to evaluate the absorption of the new water-soluble anticancer cytostatics with different properties from the rat small intestine for preclinical study by oral administration. **Material and Methods.** Conjugated with acridinium (*Acridinium NHS Ester, Toronto Research Chemicals, Canada*) cytostatics were studied: low molecular weight (1) Anthrafuranyl-Acridinium (MW 0.8 kDa) and high molecular weight (2) Aimpila-Acridinium (MW 105 kDa) and (3) L-lysine- α -oxidase (LO-Acridinium, MW 122 kDa). Absorption was determined in a modified model of an isolated «inverted» segment of the rat small intestine using flash-chemiluminescence with the calculation of the relative light units (RLU). **Results.** It was shown that the absorption level of acridinium-conjugated cytostatics depending on molar concentration ranged from 55 % (1) to 1.7–11 % (2, 3) and 2500 (1) to 9.2–188 nmol/l (2, 3), respectively. The level of internalized Anthrafuranyl-Acridinium (55 %) was consistent with the known value of the effective non-conjugated cytostatic oral dose, which was two times higher than equitherapeutical parenteral dose: 100 mg/kg vs 50 mg/kg. **Conclusion.** The data obtained allow us to consider *ex vivo* express method for preclinical study of the various water-soluble anticancer cytostatics for screening and identification of an opportunity for oral administration and estimation of starting dose. The method has a good correlation with *in vivo* tests and economically favorable due to a quick response and small number of the tested agent.

Key words: cytostatics, internalization, rat small intestine, express-method, *ex vivo*.

Введение

В последние годы показана способность к всасыванию в тонкой кишке (интернализация) не только низко-, но и высокомолекулярных веществ [1–3]. В эксперименте моторную, секреторную и функцию всасывания веществ в кишечнике изучают на животных (крысы, кролики) в моделях изолированного отрезка кишечника (фистулы) по Тири – Велла, Тири – Павлову (с сохранением иннервации кишки) или традиционным методом в «остром» опыте по Уголеву. Последний многократно апробирован на различных животных и доказал свою результативность при исследовании процесса всасывания при использовании меченых соединений [4, 5]. Это позволяет определить уровень интернализации, что значимо для цитостатиков, предназначенных для доклинического изучения при пероральном введении.

Исследуемые агенты представляют собой противоопухолевые водорастворимые цито-

статики, дающие конъюгаты с N-гидрокси-сукцинимидным эфиром акридина (*Acridinium C2 NHS Ester, Toronto Research Chemicals, Canada*; <https://www.trc-canada.com/product-detail/?CatNum=A190925>). Все агенты изучены доклинически при разных путях введения, способны в силу различных свойств или лекарственной формы (тонкокишечные капсулы) всасываться в кишечнике и рекомендованы для перорального введения. Среди них 2 высоко молекулярных белковых агента: таргетный нековалентный комплекс Аимпила, направленный на рецепторы α -фетопротейна (АФП), ингибитор апоптоза для введения в капсулах [5–7], и фермент L-лизин- α -оксидаза (ЛО), ингибитор синтеза белка с прооксидантным действием, устойчивый к действию пищеварительных протеолитических ферментов [8–12]. В качестве низкомолекулярного препарата взят инновационный синтетический аналог антрациклиновых противоопухолевых антибиотиков

Антрафуран. Он активен на опухолевых моделях парентерально и перорально и характеризуется комплексным механизмом антипролиферативной активности. Антрафуран – мультитаргетный ингибитор топоизомеразы I и II, а также ряда протеинкиназ [13–15]. Это принципиально отличает его от единственного перорального антрациклинового антибиотика идарубицина (Заведос, *Pfizer Pharma GmbH*, Германия), монотаргетного ингибитора топоизомеразы II [16, 17].

Цель исследования – оценка всасывания в тонкой кишке новых водорастворимых противоопухолевых цитостатиков с различными свойствами для доклинического изучения при пероральном введении.

Материал и методы

Животные. Использовано 11 здоровых беспородных половозрелых крыс-самок массой тела 150–200 г из питомника «Крюково», которых содержали в виварии НМИЦ при конвенциональных условиях. Для проведения эксперимента наркотизированным крысам 0,5 мг/кг золетилом (*Virbac*, Франция) выполняли аутопсию и выделяли для каждого конъюгата изолированные отрезки тонкой (тощей) кишки длиной 3–5 см из 3–4 крыс, после чего крыс умерщвляли передозировкой эфирного наркоза.

Подготовка системы. Для подготовки к опыту каждый отрезок промывали теплым раствором Рингера – Локка (37 °С) и затем быстро выворачивали для обнажения внутренней части слизистой оболочки. Один край «вывернутого» отрезка пережимали пластмассовой клипсой, заливали в полость 0,2–0,4 мл теплого раствора Рингера (инкубационная среда, ИС; *incubation medium, IM*), после чего пережимали второй конец отрезка аналогичной клипсой и помещали в емкость с ИС. Емкость с фиксированными отрезками кишки выдерживали 30 мин на шейкере, помещенном в термостат (37 °С) при постоянном перемешивании ИС для сохранения моторики кишки (рис. 1).

Уровень люминесценции в ИС измеряли до (начальный неспецифический сигнал) и после (исходный специфический сигнал) внесения тестируемых конъюгатов в различных исходных концентрациях. Через 30 мин инкубации отрезки кишки извлекали из ИС, трехкратно отмывали в теплом растворе Рингера – Локка, $t=37^{\circ}\text{C}$ и определяли уровень люминесценции в смыве с наружной стенки кишки для контроля оставшегося люминесцентного сигнала. После этого отбирали пробы ($n=3-4$) по 0,2 мл содержимого внутренней части изолированных «вывернутых» отрезков тонкой кишки для измерения специфического сигнала биоконъюгата, прошедшего через слизистую поверхность кишки. Эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями Женевской Конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990).

Оценка трансэпителиального переноса конъюгатов через стенку тонкой кишки. Измерения были выполнены на микропланшетном ридере флэш-хемилюминометре *Glomax 96* («Promega», США) по сигналу, вызванному реакцией окисления люминофора 4-(2-сукцинимидил-оксикарбонилэтил)-фенил-10-акридин-9-карбоксилат три-флюорометил сульфонат (4-(2-Succinimidyl-oxycarbonyl-ethyl)-phenyl-10-acridinium-9-carboxylate Trifluoromethyl Sulfonate, MW 0,63 кДа, *Toronto Research Chemicals*, Канада), конъюгированного с исследуемыми препаратами. Специфические характеристики измерения на люминометре: объем образца 50 мкл/лунку; активатор 1N NaOH 50 мкл/лунку; задержка между считыванием соседних лунок 1 сек; время интеграции сигнала 1 сек; время накопления сигнала 1 сек. Уровень люминесценции конъюгата определяли с помощью относительных световых единиц (*relative light units, RLU*), одна единица RLU равна одному фентомолю (10^{-15} М) АТФ. Среднее арифметическое значение.



Рис. 1. Подготовка системы «вывернутых» изолированных отрезков тонкой кишки крысы к исследованию: слева – выделение участка кишки у наркотизированной крысы; справа – термостатируемая система для изучения интернализации веществ в кишечнике

Расчет процента интернализации конъюгата. Значение RLU в образцах ИС после внесения каждого конъюгата принимали за 100 %. Через 30 мин по средним арифметическим значениям RLU, полученным от образцов внутреннего содержимого всех отрезков тонкой кишки, рассчитывали процент интернализации каждого конъюгата на 1 см и затем на всю длину кишки по формуле

$$\frac{RLU(\Sigma)/RLU(ИС) \times 100\%}{L(\Sigma)} = \frac{\%RLU}{\text{см}} \times L_k = \%RLU(\Sigma),$$

где RLU(ИС) – значение люминесцентного сигнала ИС сразу после внесения конъюгата;

RLU(Σ) – сумма значений RLU от содержимого всех отрезков тонкой кишки крысы (n=3–4) через 30 мин после внесения конъюгата;

L(Σ) – длина всех отрезков кишки (см) в системе одного конъюгата;

L_к – длина всей кишки (110 см);

%RLU/см – процент конъюгата, который переносится через 1 см кишки за 30 мин;

%RLU(Σ) – процент конъюгата, который переносится через всю длину кишки за 30 мин.

Все манипуляции выполнены в соответствии с описанной модифицированной методикой [1].

Исследованные цитостатики и их конъюгаты с Акридином

Аимпила (MW 72 кДа) – нековалентный комплекс свиного АФП и индуктора апоптоза гликозида Атрактилозида из *Atractylis Lancea* получен от ООО «Фармаксес» (Москва) в лиофилизированном виде. По результатам доклинических исследований препарат Аимпила показал эффективность при пероральном введении и рекомендован для применения в тонкокишечных капсулах [6, 7]. Конъюгат Аимпила-Акридин (MW 105 кДа) готовили по методике Р. Моро [5]. Связывание относительно небольших молекул Акридина MW 0,6 кДа с белком происходит через аминогруппу, т.е. по 55 молекул Акридина на 1 молекулу Аимпила. Концентрацию всех конъюгатов измеряли в оригинальном неразбавленном виде по методу Брэдфорда или Лоури, после разбавления ее пересчитывали с учётом фактора разбавления. Концентрация конъюгата Аимпила-Акридин после разбавления в ИС составила 1,0 мкг/мл.

Лизин-α-оксидаза (ЛО) – фермент (MW 120 кДа, удельная активность 55 Е/мг белка), ЛО получен в лиофилизированном виде [11]. ЛО эффективна при парентеральном введении при 5-кратном введении в дискретном режиме со стартовой разовой дозой 400 Е/кг; эмпирические пероральные дозы не определены [9–11]. Устойчивость ЛО в концентрации 0,17 мкМ к действию протеолитических ферментов определена в присутствии трипсина (21,7 мкМ) и химотрипсина (20 мкМ) при инкубировании (37 °С) в содержащем 0,02 М CaCl₂, 0,1 М трис–HCl буфера (рН=8,0), ошибка определения активности

ЛО <3% [9]. Конъюгат ЛО-Акридин (MW 122 кДа) готовили по той же методике [5]. Концентрация конъюгата определена по методу Брэдфорда и после разбавления в ИС составила 23 мкг/мл.

Антрафуран (MW 0,502 кДа) – метансульфонат (S)-3-[(3-амино-1-пирролидинил)карбонил]-4,11-дигидрокси-2-метилантра[2,3-b]фуран-5,10-дион, производное антра[2,3-b]фуран-3-карбоксоамида, получен в виде оранжевого мелкодисперсного порошка по методу [13]. Максимальные эффективные разовые дозы для мышей с опухолями определены эмпирически: парентеральная <50 мг/кг, пероральная <100 мг/кг [14, 15].

Конъюгат Антрафуран-Акридин (MW 0,8 кДа) готовили из лиофилизованного Антрафурана, нагревая 100 ммоль/л раствор в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) 10 мин на водяной бане при 80 °С. Затем к 800 мкл (400 мкг) раствора Антрафурана добавили 100 мкл ДМСО и 50 мкл раствора эфира Акридина в ДМСО (5 мг/мл) и смешали на вортексе без образования пены. Инкубировали при комнатной температуре 20 ч в защищенной от света пробирке. Осадок центрифугировали 10 мин при скорости 10 000 об/мин и отмывали 4-кратно от свободного Акридина, затем растворяли в 1 мл 100 мМ ФСБ. Хранили при 4 °С в защищенной от света пробирке до добавления в ИС. Концентрация конъюгата Антрафуран-Акридин была определена по методу Брэдфорд и после разбавления в ИС составила 2 мкг/мл.

Результаты

Уровень неспецифической люминесценции ИС без метки (до добавления конъюгатов) предельно мал и составляет 6–65 RLU (табл. 1, 2). Сигнал из смыва с наружной поверхности кишки также был минимальным – от 50 до 157 RLU. Следовательно, начальный и конечный сигналы были не существенны для оценки результатов всасывания конъюгатов.

Уровень люминесценции ИС после добавления 1,0 мкг/мл Аимпила-Акридина составил 1073714 RLU. Через 30 мин инкубации в просвете «вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции достиг диапазона 425–829 RLU. Всасывание на 1 см кишки составило 0,015 %, а на всю длину кишки крысы (110 см) – 1,7 %.

Уровень люминесценции ИС после добавления ЛО-Акридин в исходной концентрации 23 мкг/мл составил 814590 RLU. Через 30 мин инкубации в просвете «вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции оказался в диапазоне 2500–3540 RLU. Рассчитанная всасываемость конъюгата ЛО-Акридин на 1 см каждого отрезка тонкой кишки составила 0,1 %, для всей тонкой кишки крысы длиной 110 см – 11 %.

Уровень люминесценции ИС после добавления 2,0 мкг/мл Антрафуран-Акридин составил 2339836 RLU. Через 30 мин инкубации в просвете

Таблица 1

Люминесцентный сигнал в содержимом изолированных отрезков тонкой кишки крыс через 30 мин после внесения конъюгированных с Акридином цитостатиков в ИС

Образец		Значение RLU		
		Конъюгаты в исходной концентрации (мкг/мл)		
		АИМПИА-Акридин (1,0)	ЛО-Акридин (23,0)	Антрафуран-Акридин (2,0)
Инкубационная среда**	До внесения метки***	30	6	65
	После внесения конъюгата	1073714	814590	2339836
Содержимое отрезка тонкой кишки (3–5 см)	№1	829	2530	4534
	№2	425	3440	2396
	№3	740	3020	4720
	№4	649	3540	-
Смыв с наружной поверхности тонкой кишки крысы		50	72	157

Примечание: RLU (relativelight units) – относительные световые единицы, ** – раствор Рингера – Локка, *** – неспецифический сигнал.

Таблица 2

Всасывание конъюгированных с Акридином цитостатиков с разной молекулярной массой из тонкой кишки крысы

Конъюгат	Молекулярная масса (кДа)	Молекулярная концентрация в ИС (нмоль/л)	% всасывания из кишки за 30 мин
АИМПИА-Акридин*	105	9,2	1,7
ЛО-Акридин	122	188,0	11,0
Антрафуран-Акридин	0,8	2500,0	55,0

Примечание: * – MW Акридина 0,630 кДа (Acridinium C2 NHS Ester, Toronto Research Chemicals, Канада).

«вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции достиг диапазона 935–4534 RLU. Всасывание на 1 см кишки составило 0,5 %, а на всю длину кишки крысы (110 см) – 55 %. Отсутствие корреляции между концентрацией и интенсивностью сигнала Антрафуран-Акридина связано с индивидуальными особенностями каждой молекулы.

Расчитанное по люминесцентному сигналу всасывание из всей тонкой кишки крысы было различным и возрастало в зависимости от молярной концентрации изученных конъюгатов. Видно, что минимальное всасывание на уровне 1,7–11 % демонстрируют конъюгаты высокомолекулярных цитостатиков при молярной концентрации 9,2–188 нмоль/л. Максимальное всасывание на уровне 55 % показал низкомолекулярный конъюгированный Антрафуран при молярной концентрации 2500 нмоль/л (табл. 2).

Для конъюгата Антрафурана уровень всасывания в 55 % согласуется с величиной пероральной дозы 100 мг/кг, установленной при доклиническом изучении на животных с опухолью, которая была в два раза больше эквитерапевтической парентеральной дозы ~50 мг/кг [15]. Это дает основание считать, что уровень интернализации конъюгата

может быть использован для прогнозирования стартовой пероральной дозы цитостатика.

Заключение

Сочетание модифицированной методики изолированного «вывернутого» отрезка тонкой кишки крысы и импульсной хемилюминесценции в экспресс-методе *ex vivo* моделирует интернализацию в организм различных водорастворимых противоопухолевых цитостатиков. Уровень всасывания конъюгированных с Акридином цитостатиков с молекулярной массой от 0,8 кДа до 122 кДа варьирует от 55 до 1,7 % в зависимости от молярной концентрации от 2500 до 9,2 нмоль/л соответственно. Уровень всасывания Антрафурана (55 %) согласуется с соотношением эквитерапевтических разовых доз при пероральном введении: 100 мг/кг против 50 мг/кг. Полученные данные позволяют рассматривать экспресс-метод *ex vivo* в качестве скринингового для выявления возможности доклинического изучения различных противоопухолевых цитостатиков при пероральном введении с прогнозированием стартовой дозы. Метод хорошо согласуется с тестами *in vivo* и экономически целесообразен в силу быстрого ответа и малого количества тестируемого агента.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Yan S., Lu L., Guo Q., Hu X., Yuan Y., Li Y., Zang J. Improved pharmacokinetic characteristics and bioactive effects of anticancer enzyme delivery systems. Expert opinion on drug metabolism and toxicology. 2018; 14: 951–960. doi: 10.1080/17425255.2018.1505863.
2. Mazzaferro S., Bouchemal K., Ponchel G. Oral delivery of anticancer drugs I: general considerations. Drug Discov Today. 2013 Jan; 18(1–2): 25–34. doi: 10.1016/j.drudis.2012.08.004.
3. Sparreboom A., De Jonge M. J. A., Verweij J. The use of oral cytotoxic and cytostatic drugs in cancer treatment. Eur J Cancer. 2002; 38: 1822. doi: 10.1016/S0959-8049(01)00322-7.
4. Андронов Н.В., Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Трещалина Е.М. Оценка интернализации АФП-содержащего нековалентного комплекса АИМПЛА в модели изолированного отрезка тонкой кишки крысы. Российский онкологический журнал. 2016; 21(6): 308–311. [Andronov N.B., Tcherkassova J.R., Tsurkan S.A., Smirnova G.B., Treshalina H.M. Evaluation of the internalization of AFP-containing non-covalent complexes AIMPILA in the rat model of the isolated segment of rat small intestine. Russian Journal of Oncology 2016; 21 (6): 308–311. (in Russian)]. doi: 10.18821/1028-9984-2016-21-6-308-311.
5. Tcherkassova J., Abramovich C., Moro R., Chen C., Schmit R., Gerber A., Moro R. Combination of CA125 and RECAF biomarkers for early detection of ovarian cancer. Tumour Biol. 2011 Aug; 32(4): 831–8. doi: 10.1007/s13277-011-0186-1.
6. Réti-Nagy K., Malanga M., Fenyves E., Szente L., Vámosi G., Váradi J., Bácskay I., Fehér P., Ujhelyi Z., Róka E., Vecsernyés M., Balogh G., Vasvári G., Fenyvesi F. Endocytosis of fluorescent cyclodextrins by intestinal Caco-2 cells and its role in paclitaxel drug delivery. Int J Pharm. 2015 Dec 30; 496(2): 509–17. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.049.
7. Tsurkan S., Tcherkassova J., Gorbunova V., Treshalina H. New drug AIMPILA targeted to AFP receptor: Oral anticancer therapy and biodistribution in vivo. J Clin Oncol. 2018; 36 (15_suppl): e24232–24232. doi: 10.1200/JCO.2018.36.15.
8. Pokrovsky V.S., Treshalina H.M., Lukasheva E.V., Sedakova L.A., Medentzev A.G., Arinbasarova A.Yu., Berezov T.T. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D. Anticancer Drugs. 2013 Sep; 8(24): 846–851. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283362f2e.
9. Покровский В.С., Трещалина Е.М., Лукашева Е.В., Седакова Л.А. Разработка режима внутривенного введения лизин-альфа-оксидазы из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai vkmf-4268 под контролем переносимости и эффективности лечения. Российский онкологический журнал. 2013; 2: 10–14. [Pokrovsky V.S., Treshalina E.M., Lukasheva E.V., Sedakova L.A. Development of intravenous administration of L-lysine-alpha-oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D regime controlled by safety and efficacy of treatment. Russian Journal of Oncology. 2013; 2: 10–14. (in Russian)].
10. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka F., Yoshino Y., Misono H., Soda K. A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. J Biol Chem. 1980. 255: 976–981.
11. Lukasheva E.V., Ribakova Y.S., Fedorova T.N., Makletsova M.G., Arinbasarova A.Y., Medentzev A.G., Berezov T.T. Isolation and properties of L-Lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D. Microbiologia. 2012; 81: 594–594. doi: 10.1134/S0026261712050037.
12. Asano Y., Yasukawa K. Identification and development of amino acid oxidases. Curr Opin Chem Biol. 2019 Apr; 49: 76–83. doi: 10.1016/j.cbpa.2018.10.020.
13. Щекотихин А.Е., Трещалина Е.М., Трещалин И.Д. Пероральные противоопухолевые агенты и метод лечения рака. Патент РФ № 2639479. 2017. [Shchekotikhin A.E., Treshalina H.M., Treshalin I.D. Oral anticancer agents and method of treatment of cancer. Russian patent № 2639479. 2017. (In Russian)].
14. Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N., Treshalin M.I., Nikitin A.A., Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E. Development and pharmaceutical evaluation of the anticancer Anthrafurin/Cavitron complex, a prototypic parenteral drug formulation. Eur J Pharm Sci. 2017 Nov 15; 109: 631–637. doi: 10.1016/j.ejps.2017.09.025.
15. Tikhomirov A.S., Lin C.Y., Volodina Y.L., Dezhenkova L.G., Tatarskiy V.V., Schols D., Shitil A.A., Punit Kaur, Pin Ju Chueh, Shchekotikhin A.E. New antitumor anthra [2, 3-b] furan-3-carboxamides: Synthesis and structure-activity relationship. Eur J Med Chem. 2018 Mar 25; 148: 128–139. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.02.027.
16. Заведос. Лекарственный справочник ГЭОТАР [Интернет]. URL: <https://www.lsgeotar.ru/zavedos-3422.html>. (дата обращения: 16.04.2019). [Zavedos. Medicinal guide GEOTAR [Internet]. URL: <https://www.lsgeotar.ru/zavedos-3422.html>. (cited: 16.04.2019). (in Russian)].
17. Amin M., Pourshohod A., Kheirollah A., Afrakhteh M., Gholami-Borujeni F., Zeinalid M., Jamalane M. Specific delivery of idarubicin to HER2-positive breast cancerous cell line by trastuzumab-conjugated liposomes. J Drug Delivery Sci Technol. 2018; 47: 209–214. doi: 10.1016/j.jddst.2018.07.017.

Поступила/Received 16.04.19
Принята в печать/Accepted 24.06.19

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Трещалина Елена Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: treshalina@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-3878-3958.

Андронов Наталья Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0003-3193-4685.

Черкасова Жаннета Рашидовна, кандидат химических наук, генеральный директор ООО «Джейвис Диагностика», ИЦ Сколково (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0002-9074-7233.

Клиньский Евгений Юрьевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией онкомаркеров и новых методов диагностики опухолей, ООО «Джейвис Диагностика», ИЦ Сколково (г. Москва, Россия).

Цуркан Сергей Александрович, кандидат фармакологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории онкомаркеров и новых методов диагностики опухолей, ООО «Джейвис Диагностика», ИЦ Сколково (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0002-0030-1802.

Лукашева Елена Васильевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии им. акад. Т.Т. Березова, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0003-1029-5770.

Бабаева Гулялек, аспирант кафедры биохимии им. акад. Березова Т.Т., Медицинский институт, Российский университет дружбы народов (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0001-5781-7925.

Трещалин Михаил Иванович, старший научный сотрудник лаборатории химиотерапии и фармакологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» (г. Москва, Россия) ORCID: 0000-0002-5652-8686.

Финансирование

Публикация подготовлена при частичной поддержке Программы РУДН «5-100».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Коллектив авторов выражает особую благодарность проф. Андрею Егоровичу Щекотихину за предоставление ценного противоопухолевого препарата Антрафурана для исследований и всестороннюю поддержку.

ABOUT THE AUTHORS

Helen M. Treshalina, MD, Professor, Leading Researcher, Laboratory of Cell Immunology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia). E-mail: treshalina@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-3878-3958.

Natalia V. Andronova, PhD, Researcher, Laboratory of Radionuclide and Radiation Technologies in Experimental Oncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0003-3193-4685.

Janneta R. Tcherkassova, PhD, CEO of JVS Diagnostics LLC; Skolkovo Innovation Center (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-0030-1802.

Sergei A. Tsurkan, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Tumor Markers and New Methods of Diagnosis of Tumors «JVS Diagnostics LLC» Skolkovo Innovation Center (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-0030-1802.

Evgenii Yu. Kliniski, PhD, Head of the Laboratory of Markers and New Methods of Tumor Diagnostics, «JVS Diagnostics LLC» Skolkovo Innovation Center (Moscow, Russia).

Elena V. Lukasheva, Professor, Department of Biochemistry n.m. of Acad. T.T. Berezov, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0003-1029-5770.

Gulalek Babayeva, Postgraduate, Department of Biochemistry n.m. of Acad. T.T. Berezov, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0001-5781-7925.

Michail I. Treshchalin, Researcher, Laboratory of Chemotherapy and Pharmacology, Gause Institute of New Antibiotics (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-5652-8686.

Funding

The publication was prepared with the partial support of the «RUDN University Program 5-100».

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Professor Andrey E. Shchekotikhin for providing valuable promising anticancer agent Anthrafuran and comprehensive support.