

Глава XIII

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ В МЕДИЦИНЕ

В последние годы природные физиологически активные вещества, и в первую очередь ферменты, начинают играть все большую роль в практической медицине. Уже нашли широкое применение для тромболитической терапии такие ферменты (или их активаторы), как фибринолизин, урокиназа или стрептокиназа; для лечения некоторых видов злокачественных заболеваний эффективной оказалась аспарагиназа; пищеварительные ферменты применяются для заместительной терапии при операциях на органах пищеварения и т. д. [1].

Совсем недавно установлено, что некоторые заболевания связаны с нарушением различного рода активности лизосомальных ферментов, причем такие заболевания, как правило, не поддаются традиционным методам терапии и, в принципе, могут быть излечены только введением дефицитного фермента в организм извне [2—4].

К сожалению, повседневное клиническое использование ферментов ограничено целым рядом причин, например экономическими (дорогой и относительно малой доступностью чистых ферментов), и факторами, связанными с природой самих ферментов: их быстрой инактивацией в физиологических условиях и быстрым выведением из организма, что сильно повышает расход фермента в процессе терапии; антигенностью ферментов как чужеродных организму белков; нередкой неспецифической токсичностью ферментных препаратов; доступностью ферментов для разрушения эндогенными протеазами организма; невозможностью создания высокой локальной концентрации препарата без повышения его общей концентрации.

Перечисленные затруднения если не полностью, то в значительной мере могут быть устранены благодаря замене ферментов на иммобилизованные, что позволяет сократить общую дозу применяемого фермента и увеличить время его пребывания в организме, одновременно ослабляя нежелательные побочные эффекты.

Сформулируем в общем виде возможные пути создания иммобилизованных терапевтических ферментов. Если фермент предназначен для длительной циркуляции в кровотоке или его присутствие необходимо в различных органах, целесообразно создавать водорастворимые стабилизированные ферменты, обладающие повышенной стойкостью против различных денатурирующих воздействий физиологических механизмов инактивации и увеличенным временем циркуляции в организме. К этой же категории относятся и искусственные клетки, наполненные ферментами, в частности микрокапсулы, липосомы, «тени» эритроцитов.

Если же фермент используется лишь при терапии локальных поражений и его присутствие не требуется в иных органах, то желательно создавать биосовместимые и биodeградируемые полимерные производные ферментов, которые могут быть стандартными приемами локали-

зованы в определенном месте, чтобы в течение требуемого времени непрерывно выделять в окружающую среду активное начало. Указанные пути предполагают введение иммобилизованных ферментов непосредственно в организм. Однако в тех случаях, когда фермент действует на субстрат, присутствующий в биологических жидкостях, можно избежать введения и аккумуляции посторонних веществ в организме, используя систему экстракорпоральной перфузии [5]. При этом иммобилизованный фермент помещается в закрытую систему, через которую циркулирует биологическая жидкость, возвращающаяся обратно в организм освобожденной от вредного метаболита.

Водорастворимые препараты иммобилизованных белков

Водорастворимые стабилизированные ферментные препараты можно создать различными методами: без использования носителя и путем их связывания с водорастворимыми биосовместимыми носителями.

1. Стабилизация ферментов против денатурирующих воздействий без использования носителя осуществляется за счет:

а) химической модификации [6], б) целенаправленного наложения внутримолекулярных сшивок [7], в) процесса самостабилизации фермента при введении в его молекулу потенциально обратимых сшивок различной длины [8], г) межмолекулярного связывания белковых молекул бифункциональными реагентами. Последний случай можно рассматривать и как использование молекулы белка в качестве носителя. Поперечное связывание молекул ферментов между собой в ряде случаев (например, для α -галактозидазы — фермента, дефицит которого приводит к болезни Фабри [9], для уриказы, связанной с альбумином [10]) обеспечивает заметную стабилизацию. Кроме того, межмолекулярное связывание ферментов защищает их от переваривания в лизосомах [11]. Увеличение стабильности к физиологическим механизмам инактивации и молекулярной массы белков при межмолекулярном связывании, в свою очередь, приводит к увеличению времени их циркуляции в организме. Так, димер панкреатической рибонуклеазы, проявляющий активность, которая в сотни раз превышает активность мономера, имеет время полувыведения из кровотока крыс в 12 раз больше, чем исходный фермент [12].

Ферментный полимер на основе уриказы и альбумина [10] циркулирует в крови в течение нескольких дней. Полимер гемоглобина и его сополимер с альбумином являются эффективными переносчиками кислорода, в 5—6 раз более длительно циркулирующими в кровяном русле, чем нативный гемоглобин [13—16].

Однако образование белковых конъюгатов, имеющих большое количество детерминантных групп, способных к одновременному взаимодействию с поверхностью клетки, может приводить к увеличению их захвата клетками, что было показано на примерах захвата димеров и полимеров рибонуклеазы культурой клеток гепатомы [17] и «синусоидальными» клетками печени в опытах с нефректомированными крысами [18], а также захвата агрегатов антител гломерулярными капиллярами почек [19]. Тем не менее, согласно имеющимся данным [10], растворимые поперечно связанные ферментные полимеры могут быть довольно перспективными в ферментной терапии.

2. Второй метод получения водорастворимых стабилизированных белковых препаратов основан на модификации их растворимыми полимерами. В настоящее время насчитывается достаточное число раст-

воримых полимеров, с которыми могут быть связаны соединения, придающие полимерам фармакологическую активность [20—25]. Наиболее удобны в качестве носителей полисахариды и особенно клинические декстраны из-за высокой степени их биосовместимости [22, 26]. Пригодны для иммобилизации терапевтических ферментов и некоторые нетоксичные и неиммуногенные синтетические полимеры, например реакционные производные поливинилпирролидона, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, N-окиси поливинилпиридина, полимеры с сульфоксидными группами, полимерные гидрофильные эфиры и замещенные метакрил- или акриламидами [27]. В настоящее время исследуются возможности использования в качестве носителей растворимых полипептидных полимеров [28]. Однако известно, что вероятность иммунологической реакции организма в этих случаях несколько увеличивается.

Новые перспективы в терапии открывает применение в качестве носителей природных соединений, способных усиливать терапевтическое действие связанного с ними фермента или обладающих собственной полезной биологической активностью. Исследований в этом направлении ведется пока очень мало, но они представляют значительный интерес. Так, например, уже описана иммобилизация ферментов на природном белке коллагене [29, 30], на фибрине, лишенном антигенных свойств предварительным прогреванием [31, 32], на сывороточном альбумине человека [16, 33]. Для иммобилизации протеолитических ферментов и особенно ферментов, предназначенных для тромболитической терапии, предложено использовать гепарин [34—35].

Результаты, полученные многими авторами [20, 27], указывают на то, что молекулярная масса — важный параметр биологической активности полимеров, не содержащих связей, расщепляемых в организме. Величина молекулярной массы определяет скорость выведения полимера из кровотока и возможное отложение его в некоторых органах [36]. Полимеры специфически поглощаются рядом клеток. В общем случае они не могут проникать через клеточную мембрану путем активной или пассивной диффузии, а проходят через нее с помощью эндоцитоза, причем чем выше молекулярная масса полимера, тем выше скорость эндоцитоза. На данный процесс может оказывать влияние также химическая природа и заряд полимера [37].

Синтетические полимеры, мол. масса которых превышает 80—100 тыс., не могут выводиться через почки. Эти полимеры медленно экскретируются через печень и ее желчную систему в кишечник. Синтетические полимеры, так же как и олигомеры с мол. массой выше 1000, не могут проходить через гематоэнцефалический барьер и, следовательно, проникать в цереброспинальную жидкость. В последние годы чехословацкие ученые разрабатывают синтетические биodeградируемые полимеры на основе соединения коротких полимерных цепей мостиками, чувствительными к ферментативному расщеплению [24].

Связывание белков с растворимыми носителями осуществляется в основном с помощью традиционных методов иммобилизации, описание которых дано в работе [38] и в настоящей книге. Ковалентные связи белка с матрицей, возникающие при синтезе, обладают различной устойчивостью в физиологических условиях [24]. Так, амидные и эфирные связи не расщепляются при физиологических условиях, в то время как уретановые, карбонатные и азометиновые связи гидролизуются.

Основные эффекты, достигаемые с помощью модификации физиологически активных веществ белковой природы водорастворимыми полимерами:

во-первых, повышение конформационной стабильности и устойчивости к действию протеаз за счет многоточечного связывания с носителем и модификации остатков лизина, чувствительных к перевариванию трипсиноподобными протеазами, объемными заместителями, создающими стерические препятствия для гидролиза [39]; во-вторых, увеличение времени циркуляции в кровотоке, обусловленное помимо указанных причин уменьшением скорости фильтрации через почки в связи с увеличением молекулярной массы, предотвращением взаимодействия с поверхностными рецепторами клеток, участвующих в удалении белков из циркуляции; в-третьих, регуляция иммунного ответа организма на введение модифицированных полимерных форм ферментов.

Химическая природа носителя определяет характер влияния полимера на иммуногенные свойства конъюгированного белкового антигена. Использование полисахаридов [40] и полиэтиленгликоля [41] для модификации ферментов приводит к уменьшению иммунологических и аллергических реакций организма на введение полученных препаратов. Это связано с пониженной способностью модифицированных ферментов стимулировать образование антител и реагировать с ними. Причина в том, что модифицированные ферменты по сравнению с нативными ферментами встречают серьезные стерические затруднения для специфического взаимодействия антиген—антитело. Поэтому преиммунизация животных путем введения гетерологического терапевтического фермента в форме фермент-декстрановых конъюгатов может служить средством подавления аллергических реакций при повторных введениях экзогенных ферментов, связанных с декстранами [42].

Связывание синтетических сополимеров D-глутаминовой кислоты и D-лизина с белками приводит к образованию конъюгатов, обладающих способностью подавлять специфический иммунный ответ, угнетать образование реагиновых антител (иммуноглобулинов E), ответственных за местные и системные аллергические реакции [43]. Конъюгаты такого типа имеют большое значение в клинической практике для терапии различных заболеваний.

С другой стороны, найдено, что некоторые синтетические полиэлектролиты активно усиливают иммуногенез. Среди исследованных полиэлектролитов — полиакриловая кислота поли-4-винилпиридин, поли-2-метил-5-винилпиридин, сополимеры бромидов 4-винил-N-этилпиридина с 4-винил-N-цетилпиридином с 4-винил-N-ацетилпиридином [44]. Необходимым условием реализации иммуностимулирующего действия полиэлектролитов, соединенных с молекулой антигена, является достаточная устойчивость этого соединения в организме.

Особенно важно подчеркнуть, что найденный принцип синтеза высокоантигенных конъюгатов путем связывания специфических белков со стимулирующими полимерными носителями можно использовать для создания синтетических вакцин нового типа, способных вызвать высокий иммунный ответ ко всем антигенам у любого индивидуума, даже генетически низкореагирующего или нереагирующего [44].

Протеазы животного, растительного и микробного происхождения находят широкое применение в клинической практике для заместительной терапии при хирургических вмешательствах на органах пищеварения, для лечения больных с тромбозами и различными гнойно-воспалительными процессами в качестве некролитических и противоотечных средств [1, 44—48]. Однако недостаточная стабильность протеаз по отношению к температурным факторам, денатурирующим агентам, к автолизу, их способность подвергаться действию ингибиторов крови и

тканей, а также антигенные и аллергенные свойства ограничивают их практическое применение.

Препараты протеолитических ферментов, связанных с водорастворимыми носителями, в большинстве случаев лишены указанных недостатков. Конъюгаты протеаз с водорастворимыми носителями значительно чаще сохраняют одинаковую активность по отношению к белковым и низкомолекулярным субстратам, чем соответствующие нерастворимые производные, что показано на примерах субтилизина [49], α -химотрипсина [50], террилитина [51]. Связывание трипсина [52—58], α -химотрипсина [50, 56, 59—63], стрептокиназы [64] с полисахаридами, полимерами и сополимерами винилового ряда приводит к получению производных, более стабильных по отношению к тепловой инактивации, автолизу и характеризующихся ослаблением сродства (от нескольких раз до 10^4 раз) или неполным ингибированием природными ингибиторами. Как отмечено в работе [65], наблюдается корреляция между изменением величин сродства ферментных препаратов к ингибиторам сыворотки крови и острой токсичностью препаратов. Кроме того, антигенные, иммуногенные и аллергенные свойства протеиназ, особенно микробного происхождения (стрептокиназы [64], террилитина [65]), модифицированных растворимыми полимерами, гораздо меньше выражены, чем у нативных. В результате модифицированные растворимыми полимерами протеазы сохраняют высокую активность *in vivo*: калликренн, ковалентно-связанный с поливинилпирролидоном, способен понижать кровяное давление у собак [66]; стрептокиназа, связанная с углеводсодержащими матрицами, эффективно лизирует искусственные тромбы [64].

Что касается других гидролитических ферментов, то связывание глюкозидаз — α -амилазы [39, 67] и лизоцима [59] с декстраном, лизосомальной гидролазы (β -D-N-ацетилгексозаминидазы) — фермента, важного для лечения болезни Тая—Сахса — с поливинилпирролидоном [68] — приводит к стабилизации по отношению к экзогенным протеиназам, а также к увеличению времени выведения модифицированных ферментов из кровотока экспериментальных животных.

Стабилизированные ковалентным связыванием с растворимым *m*-аминобензилоксиметилдекстраном нуклеодеполимеразы обладают более высокой активностью при использовании их в качестве лекарственных препаратов [69, 70].

Модификация водорастворимыми полимерами — перспективный метод для стабилизации терапевтических ферментов с субъединичной структурой. Полисахаридные производные гемоглобина, полученные с целью создания клинического кровезаменителя — переносчика кислорода путем ковалентного связывания с бром- [71, 72], amino- [16, 71] и диальдегид-производными декстрана [16], характеризуются увеличением периода полувыведения гемоглобина из кровяного русла в 3—23 раза. У гемоглобина, модифицированного диальдегиддекстраном, сохраняется тетрамерная форма и меньшая чувствительность к тепловой денатурации, чем у нативного белка [16]. Опыты, проведенные на обескровленных животных (при гематокрите $< 2\%$), показывают, что трансфузия комплекса декстран — гемоглобин позволяет добиться выживания, а затем и полного выздоровления животных без дополнительного обогащения воздуха кислородом [73, 74].

При исследовании влияния ковалентного связывания полисахаридов и полиэтиленгликоля на свойства ферментов с различным типом четвертичной структуры изучены димер-карбоксипептидаза G [75], тетрамеры-аргиназа микробного [75] и животного [76] происхождения, ка-

талаза [67, 77, 78], глутаминаза-L-аспарагиназа, фенилаланин аммиак-лиаза, а также уриказа животного и микробиологического происхождения [76].

Модификация указанных ферментов полимерами делает их более устойчивыми к термоинактивации, протеолитическому перевариванию и увеличивает время циркуляции в кровотоке даже при многократных инъекциях. Заслуживает особого внимания снижение антигенности [78], исчезновение иммуногенности и увеличение способности проникать через мембраны у большинства ферментов, модифицированных полиэтиленгликолем [76], что особенно важно в терапии.

Использование препаратов, модифицированных декстраном карбоксипептидазы G и аргиназы [75], для внутрибрюшинного введения мышам с привитой мастоцитомой P815Y позволяет достичь более высокой концентрации ферментов в плазме и в 6 раз более медленной скорости их адсорбции из брюшной полости. При лечении мышей с привитой лимфосаркомой 6СЗНЕД и другими видами опухолями глутаминазой-L-аспарагиназой, модифицированной полиэтиленгликолем, время жизни выживших животных составляет 20—24 дня, это указывает на удвоенную эффективность модифицированного фермента по сравнению с нативным [76].

При использовании полипептидов в терапевтических целях с неизбежностью встает вопрос о пролонгировании их действия. Одним из физиологически активных полипептидов, нашедших широкое применение в медицинской практике, является поливалентный ингибитор протеаз из поджелудочной железы крупного рогатого скота (мол. масса 6513). Панкреатический ингибитор эффективно ингибирует калликреин, трипсин, химотрипсин, плазмин, активаторы плазмина, факторы свертывания крови, тканевые и лейкоцитарные протеиназы [79]. В связи с этим панкреатический ингибитор применяется при лечении различных заболеваний: аллергических реакций, шоков различной этиологии, сепсиса, острого панкреатита, механических и термических травм, артрозоартритов, первичных гиперфибринолитических кровотечениях и коагулопатии потребления [46, 79—82]. В последние годы появились сообщения об использовании панкреатического ингибитора при лечении сердечно-сосудистых заболеваний [83—85]. Панкреатический ингибитор, применяемый при инфаркте миокарда, обладает эффективным антиишемическим действием, уменьшает некротическую зону и улучшает коллатеральное кровообращение [84].

Терапевтические дозы панкреатического ингибитора протеаз очень велики в связи с его быстрым выведением из кровотока. Время полужизни ингибитора зависит от вида животного, от дозы и составляет 10—70 мин [86]. Для пролонгирования действия панкреатического ингибитора протеаз получен ряд его препаратов, модифицированных растворимыми полисахаридами [87—89]. Панкреатический ингибитор относится к классу белков, в функционировании которых аминокетонам отводится важная роль. Поэтому попытки связывать панкреатический ингибитор с полисахаридами, используя в качестве активирующих носителей агентов бромциан или перйодат, приводят к получению препаратов, не обладающих активностью или содержащих малое количество белка (0,5%) с пониженной ингибирующей активностью [90]. Разработаны приемы, позволяющие получать высокомолекулярные препараты панкреатического ингибитора с полным сохранением ингибирующей активности, кинетических и равновесных параметров реакции ассоциации с протеазами [91, 92]. Изучение поведения препаратов панкреатического ингибитора, связанного с растворимой отрицательно заряжен-

ной полисахаридной матрицей, показывает, что время циркуляции в кровотоке крыс увеличивается в 10 раз по сравнению с нативным ингибитором. Кроме того, существенно уменьшается накопление модифицированного ингибитора в почках [93]. Применение растворимого высокомолекулярного панкреатического ингибитора для лечения острого панкреатита у собак увеличивает в 1,5 раза выживаемость и в 2 раза продолжительность жизни погибающих животных [93].

Исследование подобных препаратов направлено не только на создание новых типов лекарственных средств. Эти препараты можно использовать также для выяснения механизмов некоторых биохимических процессов, протекающих в живом организме. В этом случае обычно сравнивают эффекты, наблюдаемые для нативных физиологически активных соединений и для их модифицированных полимерами производных.

В настоящее время известно большое количество работ, посвященных ковалентному связыванию инсулина с полимерными носителями [94—96], в ряде случаев отмечается пролонгирование действия модифицированных препаратов гормона [97—100]. Сравнительное изучение в экспериментах на животных эффекта инсулина, модифицированного растворимыми полимерами различной природы и различной молекулярной массы, и нативного инсулина на уровень глюкозы в крови обнаруживает, что величина эффекта и время его наступления не зависят от молекулярной массы полимерного модификатора [97, 101—103]. Приведенные результаты подтверждают высказанное ранее предположение [104] о локализации рецепторов инсулина на наружной стороне клеточной мембраны.

Микрокапсулированные ферменты

Микрокапсулы клеточных размеров, содержащие высокие концентрации фермента и белкового наполнителя и имеющие ультратонкую мембрану, являются искусственной имитацией клеток [105]. Микрокапсулированные ферменты обладают целым рядом достоинств для терапевтических целей: а) защитный барьер в виде полупроницаемой оболочки вокруг раствора фермента исключает контакт его с жидкостью организма; б) отношение фермента к полимеру составляет 1 000 000 : 1, так как большие концентрации фермента могут быть включены в микрокапсулы; в) отношение площади поверхности к объему микрокапсул экстремально высокое (2500 см²/1 мл микрокапсул диаметром 20 мкм), в результате чего проникновение субстратов через мембрану происходит очень быстро; г) фермент в капсулах стабилизирован по сравнению с нативным; д) в микрокапсулы могут быть заключены экстракты, интактные клетки, суспензии, ферменты с ионообменными смолами или активированным углем, несколько ферментов одновременно.

К недостаткам микрокапсул относится образование тромбов и накопление полимера в организме при неоднократном их введении. Поэтому ведутся работы по созданию нетромбогенных, биосовместимых и биodeградируемых оболочек микрокапсул.

Микрокапсулированные ферменты могут контактировать с циркулирующей системой [105—107], вводиться в организм в виде тонкой суспензии внутримышечно, подкожно или внутривенно [105, 107—110] или применяться перорально [105, 111—115] и локально [116].

Примером микрокапсулированного фермента как детоксиканта и искусственного органа является уреаза [105]. Первые результаты по

использованию микрокапсулированной уреазы опубликованы в работе [38]. В последующих работах предлагается капсулировать стабилизированную уреазу [113—115], а также уреазу вместе с адсорбентом аммиака для более эффективного удаления последнего [105, 111, 112]; пероральное введение таких микрокапсул значительно понижает уровень мочевины в крови животных.

Недостаток каталазы в организме животных и человека вызывает акаталаземию. У акаталаземических мышей каталазная активность в крови составляет 2% и в теле 20% от нормы. Внутривентрикулярная инъекция акаталаземическим мышам микрокапсулированного фермента эффективно заменяет недостающий фермент [109].

Микрокапсулированная каталаза применяется также для локального лечения ран. При акаталаземии у животных и человека в ротовой полости образуются раны, вызванные перекисью водорода, выделяемой бактериями. Микрокапсулированная каталаза, введенная в ротовую полость человеку и мышам, действовала эффективно на H_2O_2 и не вызывала побочных отрицательных эффектов, имеющих место при использовании нативного фермента [116].

На примере микрокапсулированной L-аспарагиназы показана возможность эффективного подавления роста субстратзависящих опухолей [105, 108, 110, 111, 117—120]. Использование комбинированной системы, включающей микрокапсулированную аспарагиназу и искусственную капиллярную систему, содержащую гепарин, позволяет проводить более длительную гемоперфузию [106].

Недавно разработаны биodeградируемые оболочки микрокапсул, например, из полимолочной кислоты, распадающейся в организме до H_2O и CO_2 [121, 122]. Биodeградируемость оболочки микрокапсул открывает еще один путь терапевтического использования микрокапсул для массовой вакцинации и иммунизации населения путем одноразовых инъекций микрокапсулированных вакцин и антигенов [121—123].

Микрокапсулированные мультиферментные системы могут найти применение в терапии при расстройствах обмена веществ. Так, например, показана возможность рециклизации кофакторов [124, 125] и образования аминокислоты из мочевины и аммиака [126] с помощью микрокапсулированных систем. Кофактор, предварительно иммобилизованный на нерастворимом носителе, при микрокапсулировании мультиферментной системы остается внутри капсул, рециклизуется там и используется повторно [125].

Включение белковых лекарств в липосомы

В последние годы широко исследуется новый способ иммобилизации ферментов — включение в липосомы [127]. Липосомы — это бислойные сферические образования, получаемые при определенных, чаще всего механических, воздействиях на дисперсии фосфолипидов в воде. Для получения липосом используются как нейтральные фосфолипиды, например лецитин, фосфатидилхолин дипальмитоил, фосфатидилхолин димиристоил и т. п., так и заряженные фосфолипиды, например фосфатидил этаноламин, фосфатиновая кислота и т. п.; при этом для придания мембранам получаемых липосом достаточной жесткости в липидную смесь вводят дополнительно некоторое количество холестерина [128].

Очевидно, что включение ферментов в липосомы в первую очередь предохраняет ферменты от воздействия инактивирующей внешней среды — изменения рН, действия высокомолекулярных токсинов и

ингибиторов, атаки микроорганизмами или какими-либо расщепляющими ферментами. Менее вероятно повышение термостабильности, хотя иногда исследователи отмечают и этот факт, как, например, в случае включенной в липосомы аспарагиназы [129].

К настоящему времени описано включение в полученные тем или иным способом липосомы различного состава таких ферментов, как глюкозооксидаза [130], глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, β -галактозидаза и гексокиназа [131, 132], β -глюкуронидаза [133], глюкоцереброзидаза [134], декстраназа [135], α -манозидаза [136], амилоглюкозидаза [137, 138], гексоаминидаза А [139], лизоцим [140], пероксидаза [141], β -D-фруктофуранозидаза [142], нейраминидаза [143], цитохромоксидаза [144], Na^+ , K^+ -АТФаза [145] и некоторые другие. Обычно удается включить в липосомы от 1 до 15% находящегося в водном растворе фермента, причем фермент, как правило, полностью сохраняет свою активность. Липосомы полностью биосовместимы, не вызывают иммунологических, аллергических или пирогенных реакций, а после их разрушения составляющие их фосфолипиды могут быть утилизированы в качестве компонентов клеточных мембран. Более того, липосомы дают уникальную возможность введения терапевтического фермента внутрь клеток, с которыми липосомы взаимодействуют путем слияния с клеточной мембраной или путем эндоцитоза с последующим попаданием в лизосомы [127].

Мы не будем останавливаться на экспериментах по механизмам взаимодействия липосом с белками, по способам варьирования физико-химических свойств липосом, по механизмам попадания липосом или их содержимого внутрь клеток и т. п., достаточно полный обзор которых дан в работах [128, 146]; кратко рассмотрим, как используют липосомы в терапевтических целях.

Прежде всего нужно указать, что детально изучено распределение липосом по различным органам при их введении животным. Оказалось, что уже в первые 15—30 мин после введения, практически независимо от способа введения, фосфолипидного состава липосом, от размеров или заряда, основная часть — от 50 до 80% — липосом оказывается поглощенной клетками ретикулоэндотелиальной системы, в первую очередь печенью и селезенкой [133, 137, 142, 147—150]. Интересные перспективы открывает единственное пока исключение — обнаруженный недавно факт аккумуляции нейтральных или положительных заряженных липосом в области экспериментального инфаркта миокарда [151]. Это сразу привело ученых к двум выводам: во-первых, транспорт лекарств с помощью липосом может оказаться особенно перспективным для лечения некоторых заболеваний ретикуло-эндотелиальной системы, и в первую очередь печени; во-вторых, если требуется осуществить доставку содержимого липосом в другие органы и ткани или просто реализовать длительную циркуляцию липосом в кровотоке, то следует создать липосомы, тем или иным способом защищенные от преждевременного поглощения клетками печени.

Работы по созданию не поглощаемых печенью липосом уже довольно широко ведутся. Здесь можно отметить три основных подхода: предварительное или одновременное насыщение гипотетических центров связывания липосом в организме «холостыми» (пустыми) липосомами [137, 152]; покрытие поверхности липосом различными веществами, предохраняющими липосомы от взаимодействия с клетками [153, 154]; формирование липосом из аналогов фосфолипидов, не подверженных расщеплению фосфолипидагидролизующих ферментов типа фосфолипидацилгидролаз и фосфолипидацилтрансфераз [155, 156].

Важной характеристикой содержащих терапевтическое средство липосом служит скорость выхода из них активного начала. Показано, что в условиях *in vitro* практически независимо от типа включенного вещества средняя скорость выхода включенных в липосомы соединений наружу порядка 1%/ч [146]. Сложнее определить этот параметр в условиях *in vivo*. Из экспериментальных данных и общих соображений следует, что моноламеллярные липосомы более проницаемы, чем мультламеллярные [128]. Обычно считается, что время существования интактных липосом в кровотоке не превышает десятков минут (незначительные популяции интактных липосом могут обнаруживаться и в более отдаленное время). Вместе с тем в работе, где экспериментаторы использовали два радиоактивных маркера — мембранный и внутренний, — заметная радиоактивность, связанная с содержащими альбумин липосомами, при постоянстве отношений активностей обоих маркеров была обнаружена в течение 250 мин [137]. Основная масса терапевтических систем использует для включения в липосомы различные низкомолекулярные лекарственные соединения или соединения олигопептидного характера. Среди ферментов, иммобилизованных включением в липосомы, находятся такие важные для терапии ферменты, как аспарагиназа [129]. В экспериментах на мышах показаны увеличение времени проявления ферментативной активности включенной в липосомы аспарагиназы, ее эффективность в лечении экспериментальных опухолей, снижение ее антигенных свойств [158]. Включена в липосомы и уреаза, которая в результате приобретает повышенную устойчивость к изменениям pH и температуры; в этом случае на 10 мг липида удается ввести около 1 мг белка [159].

Предполагают, что введение белковых ингибиторов лизосомальных протеиназ в липосомы может быть полезным при лечении воспалительных заболеваний соединительной ткани, в частности ревматоидного артрита [128]. Впечатляюще выглядят результаты использования включенной в липосомы глюкоцереброзидазы для лечения человека, страдающего болезнью Гоше, связанной с нарушением метаболизма глюкоцереброзидов, которые накапливаются в клетках ретикуло-эндотелиальной системы в результате дефицита соответствующего лизосомального фермента. Терапия нативным ферментом не дает результатов, так как такой фермент не может проникнуть внутрь клетки и попасть в лизосомы, где требуется его присутствие. В то же время 13-месячное лечение пациента включенным в липосомы ферментом, способным проникать внутрь клеток, дало ярко выраженный положительный эффект, в частности уменьшение размеров печени [134, 160]. Заслуживает также внимания попытка лечения пациента с гликогенозисом II типа, вызванным накоплением гликогена из-за дефицита лизосомальной амилоглюкозидазы, соответствующим ферментом, включенным в липосомы. За неделю лечения, когда было введено 3 мг фермента в 170 мг фосфолипида, исследователи отметили ряд благоприятных явлений, в частности уменьшение размеров печени [136].

Включение ферментов в «тени» эритроцитов

Ферменты могут быть введены внутрь частично гемолизованных эритроцитов с последующим восстановлением целостности мембраны эритроцита, в результате чего мембрана эритроцита оказывается заполнена не цитозолом с его обычными компонентами, а соответствующим ферментом [161]. Таким образом, в эритроциты были введены β -глюкозидаза, β -галактозидаза [162] и некоторые другие ферменты

[163]. Включенные в эритроциты ферменты во всех отношениях напоминают ферменты, включенные в липосомы: они обладают стабильностью по отношению к изменениям рН, иногда проявляют повышенную термостабильность, не подвергаются действию природных ингибиторов и протеаз, способны к медленному выходу наружу; однако, поскольку практически неизменной остается мембрана эритроцита, можно надеяться, что время циркуляции наполненных ферментом клеток будет сравнимо со временем циркуляции «живых» эритроцитов и они будут медленнее выводиться из циркуляции печенью. Так, было показано, что заметно увеличивается время, в течение которого сохраняется в циркулирующей крови активность аспарагиназы [164] и β -глюкуронидазы [165, 166], если их включить в эритроциты; эксперименты проводились на мышах и обезьянах. Имеется в научной литературе и пример использования включенной в «тени» эритроцитов глюкоцереброзидазы для лечения пациента с болезнью Гоше [167].

Проблемы и перспективы направленного транспорта лекарств в организме

Одной из существенных сложностей, возникающих при использовании нативных ферментов в терапии, является невозможность направленного транспорта ферментного препарата в очаг поражения. Поэтому для создания достаточно высокой локальной терапевтической концентрации препарата приходится создавать и высокую общую концентрацию фермента в организме, что, как правило, ведет к многочисленным нежелательным последствиям. Имобилизация биологически активных веществ белковой природы открывает перспективные пути для создания систем, обеспечивающих транспорт лекарственных средств от места их введения до места их действия. Основные принципиальные и теоретические подходы к созданию такого рода систем предложены в работах [168, 170]. Среди путей, с помощью которых может осуществляться накопление лекарственных средств в органе-мишени, следует указать, во-первых, усиление специфической и неспецифической ресорбции на поверхности клеток с помощью присоединения к полимеру-носителю ряда групп типа сульфоксидных, формамидных, способствующих переносу лекарств через различные мембраны; во-вторых, усиление скорости захвата лекарственного средства, связанного с носителем, клетками, обладающими высокой эндоцитотической активностью, например раковыми клетками и клетками ретикуло-эндотелиальной системы; в-третьих, аффинную фиксацию лекарственных средств на поверхности клеток с помощью присоединения к носителю лигандов, обладающих специфическим сродством к характеристическим компонентам органов, так называемых мишеней, например лигандов рецепторов [171], антител.

В последнее время значительное место в биологических механизмах «узнавания» отводится углеводам [172]. В этой связи особый интерес представляют асиалогликопротеины в качестве растворимых носителей, реализующих принцип связывания с рецептором на поверхности клетки для направленного транспорта белков.

Как известно, остатки сиаловых кислот в гликопротеинах играют защитную роль в процессе выведения гликопротеинов из циркуляции [173, 174]. Удаление концевых остатков сиаловых кислот обнажает остатки галактозы и приводит к быстрому захвату асиалогликопротеинов паренхимальными клетками печени, поверхность которых содержит рецепторы остатков галактозы [175]. При этом необходимо присутствие

интактных остатков галактозы в виде концевых, невосстанавливающих сахаров, их окисления галактозо-оксидазой [176] или удаление β -галактозидазой [177] вызывает увеличение времени циркуляции модифицированного гликопротеина и приводит к величинам, близким ко времени циркуляции нативного гликопротеина.

Используя ковалентное связывание лизоцима и альбумина с асиалогликопептидами фетуина [178] и глутаминазы с асиалоорозомукоидом [179], удалось направить указанные белки в печень. Несмотря на быструю инактивацию глутаминазы в печени из-за переваривания ее лизосомальными ферментами, наблюдается селективное уменьшение уровня глутамина в течение некоторого времени [179]. Эти данные позволяют предполагать, что при идентификации специфических рецепторов на клетках органа-мишени станет возможной орган-специфическая противоопухолевая терапия.

Для достижения аналогичного эффекта в последнее время используют искусственное введение остатков галактозы в молекулу фермента путем связывания лактозы с ϵ -аминогруппами остатков лизина, при этом для захвата 50% белка печенью необходимо ввести 8—10 остатков лактозы на молекулу белка [180]. Результаты, полученные по восстановительному лактозоаминированию аспарагиназы [181] и димера рибонуклеазы [180], показывают, что предложенный метод обеспечивает направленный транспорт терапевтических ферментов в печень даже в том случае, когда белок имеет достаточно малую молекулярную массу и быстро выводится через почки.

Кроме упомянутых асиалогликопротеинов для направленного транспорта лекарственных средств в печень могут быть использованы агалактогликопротеины [182, 183] и некоторые лизосомальные ферменты [183], которые в значительной степени захватываются клетками Купфера. Агексозаминогликопротеины обладают специфическим сродством к клеткам почек [182]. Среди потенциальных носителей называют также трофические гормоны и лектины [184].

При использовании липосом в качестве носителей лекарственных средств принцип связывания лигандов поверхностных рецепторов клеток также находит свое применение. Недавние исследования показали, что гликолипидсодержащие липосомы (гликолипид встроен в мембрану липосомы) могут специфически связываться с лектинами [185], антителами [186] и клетками [187]. Ганглиозидсодержащие липосомы могут специфически связываться с клетками печени, содержащими на наружных мембранах лектиноподобные молекулы [188].

Однако желаемая широта выбора органа-мишени может быть достигнута, по-видимому, лишь с использованием иммуноглобулинов в качестве специфических макромолекулярных лигандов, связанных с носителем. Первые попытки осуществить направленный транспорт лекарственных средств, связанных с растворимыми носителями, посредством антител были сделаны с цитотоксическими веществами и антителами, специфическими к клеткам различных опухолей [189, 170].

В последнее время предлагается использовать растворимые полимерные носители, несущие протеазы, коллагеназу, фибринолизин, холестеринэстеразу и антитела против атерогенных классов липопротеинов, для лечения атеросклероза, а также связанные протеазы, гиалуронидазу и различные матричные антитела для лечения заболеваний почек [170].

Перспективным представляется и присоединение специфических антител к поверхности липосом. Так, показано, что липосомы с адсорбированными на их поверхности агрегированными неспецифическими

иммуноглобулинами классов I_gG или I_gM в несколько раз больше захватываются культурами фагоцитов [139, 190]. Увеличение захвата покрытых иммуноглобулинами липосом клетками отмечено и в других работах [191]. Специфичность и эффективность связывания можно еще больше повысить благодаря использованию специфических иммуноглобулинов против соответствующих штаммов, что и было отмечено в ряде исследований по захвату радиоактивно меченных липосом, когда культуры фибробластов, мышинных лейкемических и некоторых других клеток в 3—25 раз сильнее связывали липосомы, покрытые специфическими иммуноглобулинами [192]. К сожалению, как видно из приведенных данных и как специально отмечено в обзоре Финкельштейна [128], полученные эффекты не слишком велики и не позволяют реально говорить о возможности направленного транспорта.

Дело заключается в том, что, во-первых, использовавшиеся ранее способы связывания антител с липосомами не позволяли прочно связать достаточное количество белка или вызывали его частичную инактивацию; во-вторых, отсутствие чистых специфических антител не позволяло достичь высокой эффективности специфического связывания. Описанный недавно метод ковалентного связывания специфических макромолекулярных лигандов с поверхностью липосом через «ножку» позволяет связывать значительные количества белка без нарушения его специфических свойств и без нарушения целостности липосом [193, 194], и поэтому с его помощью можно решить некоторые из перечисленных проблем. Более того, с использованием описанного метода и фракции чистых антител против миозина из сердечной мышцы собаки удалось показать, что связанные с липосомами антитела полностью сохраняют способность взаимодействовать с миозином в растворе (по данным реакции иммунопреципитации с меченым миозином), эффективно связываются с антигеном в виде иммуносорбента (при гель-хроматографии на миозин-сефарозе-4В) и способны транспортировать липосомы в зону экспериментального инфаркта миокарда [195]. Таким образом, уже существует реальная система, которая может использоваться в диагностических и терапевтических целях и которая работает по принципу направленного транспорта.

Препараты иммобилизованных белков для местного применения

Для лечения локальных, а не системных заболеваний нужно создать препараты иммобилизованных тем или иным способом ферментов, которые могут быть локализованы в определенном месте организма и способны к постепенному выделению с заданной скоростью иммобилизованного фермента в окружающую среду. Это создает локальное депо ферментного препарата в организме. В результате местная терапевтическая концентрация лекарства будет высока, тогда как общая концентрация чужеродного белка — фермента, в организме будет пренебрежимо мала.

Хотя работы по созданию препаратов полимерных лекарств, медленно выделяющих активное начало в окружающую среду, ведутся достаточно давно [196], в большинстве случаев речь шла только о синтетических низкомолекулярных, физиологически активных соединениях. Работы по созданию именно ферментных препаратов такого типа начались только в последние годы. При этом можно условно разбить все известные работы на два типа.

1. Согласно одной из разрабатываемых схем [197, 198], биологически активные белковые макромолекулы (опыты проводились с трип-

сином, ингибитором трипсина, лизоцимом, щелочной фосфатазой, каталазой и некоторыми другими белками) включают в процессе формирования в таблетки или гранулы, состоящие из различных биосовместимых полимеров (были исследованы полиакриламид, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, сополимеры этилена и винилацетата и некоторые другие). При таком способе иммобилизации скорость выхода белка из полимера в зависимости от молекулярной массы белка и от «плотности» полимерной матрицы может составлять от 0,01 до 1% в день. Следует отметить, что, находясь в полимере, фермент практически полностью защищен от воздействия агрессивной физиологической среды. Вместе с тем из полимера фермент выходит в нативной форме, и скорость его последующей инактивации и выведения, как и вызываемые им токсичные, аллергические, пирогенные и иммунные реакции, та же, что и для нативного фермента, применяемого традиционным способом. Наиболее впечатляющим успехом этого направления представляется получение иммобилизованного ингибитора фактора роста сосудов опухоли [197]. Имплантаты полимерных гранул, содержащих этот фактор, в течение долгого времени блокировали рост экспериментальной твердой опухоли в роговице глаза кролика.

2. Ферменты иммобилизуют также в структуре волокон и пленок в процессе их формирования [199].

Пленки из нерастворимых в воде полимеров, содержащие протеолитические ферменты, используются в качестве дренирующих материалов для лечения различных гнойных ран. Благодаря постепенному длительному выделению из пленок небольших доз протеолитических ферментов пленки обладают высокой и длительной дренирующей способностью, а также некролитической активностью, они служат без смены в течение длительного времени, что исключает разрушение образующейся в ране грануляционной ткани, которое имеет место при частой смене обычных дренирующих материалов, ускоряет очищение ран в 3—4 раза по сравнению с обычными марлевыми или резиновыми дренажами [200].

Пленки из растворимых в воде полимеров, содержащие протеолитические ферменты, также используются для лечения гнойных ран с целью ускорения их очищения. Эксперименты, проведенные на кроликах, показывают, что применение указанных пленок сокращает сроки очищения гнойных ран в 2 раза (по сравнению со сроками очищения аналогичных ран, достигаемыми при использовании нативных протеаз), кроме того, существенно уменьшается расход протеолитического фермента [200, 201].

Применение хирургического шовного материала из волокна, содержащего трипсин, позволяет существенно уменьшить микробную обсемененность «чистых» и инфицированных ран у экспериментальных животных, вследствие чего ускоряется заживление ран [202].

С другой стороны, возможно создание препаратов ферментов, иммобилизованных на биodeградируемом носителе [203, 204]. При этом скорость выхода фермента в окружающую среду определяется скоростью разрушения носителя в физиологических условиях, но фермент «включается в работу» ковалентно-связанным с фрагментом носителя, который не только дополнительно стабилизирует фермент, но и уменьшает вызываемые последним нежелательные биологические реакции организма. В названных исследованиях носителями служат преимущественно гранулы сефадекса, т. е. химически сшитого производного биосовместимого природного полисахарида декстрана. В результате периодатного окисления сефадексы приобретают (по-видимому, путем

частичной окислительной деструкции сшивок) способность к медленному растворению в водных средах, причем скорость этого растворения зависит от степени модификации носителя и может составлять от нескольких часов до нескольких дней [204].

На полученных таким способом носителях был иммобилизован целый ряд терапевтических ферментов — фибринолизин, стрептокиназа, урокиназа и др. [204]. Удастся связать от 10 до 80 мг фермента на 1 г носителя и при последующем полном переходе с носителем в раствор практически весь связанный фермент оказывается биологически активным.

Полученные препараты иммобилизованных ферментов следует считать перспективными для применения их в медицине, особенно для терапии тромбозов с помощью локального депонирования иммобилизованных тромболитических ферментов. Так, например, впервые описано применение малой (стократно меньшей по сравнению с обычно применяемой дозой нативного фермента) дозы иммобилизованного фибринолизина, депонируемого методом катетеризации непосредственно в район расположения тромба, для лизиса экспериментального тромба в бедренной артерии собаки [205, 206]. Применение всего лишь 1000 ед. иммобилизованного фибринолизина позволило уже через час полностью лизировать массивный тромб в бедренной артерии экспериментального животного.

В эксперименте на собаках было также показано, что иммобилизованный на модифицированном сефадексе белок может быть депонирован даже в таком жизненно важном органе, как миокард (известно, что тромбоз коронарных артерий нередко бывает причиной инфаркта миокарда). При этом время пребывания белка или лекарственного тромболитика в миокарде может быть увеличено с 1 ч в случае нативного фермента до двух и более суток [207], а присутствие носителя не оказывает вредного воздействия на миокард, по данным гистологических, гистохимических и электрокардиографических исследований.

Использование реакторов с иммобилизованными ферментами в экспериментальной медицине

Рассмотренные нами методы использования иммобилизованных физиологически активных веществ белковой природы в экспериментальной медицине предусматривают введение в организм посторонних веществ. Исследования последних лет, однако, показали, что подобные методы хотя и позволяют продемонстрировать преимущества использования иммобилизованных ферментов, тем не менее в ряде случаев не являются оптимальными для клинического применения. Это показано на примере аспарагиназы [208]. Принципиально иной путь — это использование иммобилизованных терапевтических ферментов в специальных реакторах [209].

В разных по конструкции ферментных реакторах иммобилизованные ферменты применяются в различных формах: в виде спирально свернутых мембран, твердых частиц, трубок, пластин. Ферментативные реакторы предназначены в основном для двух целей: 1) для перфузии биологических жидкостей (крови, лимфы и др.) через экстракорпоральный шунт; 2) для имплантации в качестве протеза кровеносного сосуда.

Ферментные реакторы характеризуются следующими преимуществами перед другими методами использования иммобилизованных ферментов в медицине: во-первых, с их помощью можно избежать непо-

средственного контакта различных органов с чужеродным белком и этим уменьшить иммунологическую реакцию организма и токсичность препарата; во-вторых, на их основе удается регенерировать иммобилизованный белок и многократно его использовать, что приводит к экономии ферментов и удешевлению лечения; в-третьих, реакторы открывают возможность проводить долговременное лечение (непрерывное или прерывистое) [121, 209].

С другой стороны, возможны некоторые осложнения:

а) иногда наблюдается образование фиброзной пленки на поверхности протеза [210] или реактора [211], для предотвращения которой нужно постоянно вводить гепарин в кровоток животного [212];

б) иногда происходит гемолиз и изменение количества форменных элементов крови, особенно в реакторах, обладающих большим сопротивлением току крови. Так, например, гранулы легко разрушают эритроциты и тромбоциты, в то время как носители, имеющие мембранную структуру, являются более совместимыми [213]. Тем не менее обычно формула крови быстро нормализуется после прекращения перфузии [214];

в) иногда возможна неспецифическая сорбция белков крови на носителе [215].

Исследование кинетики ферментативных реакций в трубчатых и колоночных реакторах указывает, что нужно учитывать влияние диффузии на скорость ферментативной реакции, даже в системах с участием низкомолекулярных субстратов [210, 215, 216].

Метод экстракорпоральной перфузии базируется на двух принципах: 1) использование каталитических свойств иммобилизованного фермента, 2) использование аффинных свойств иммобилизованных белковых молекул.

Первый принцип реализуется в ферментных реакторах для лечения субстрат-зависимых форм опухолей. Наибольшее количество работ посвящено L-аспарагиназе, включенной в волокна из триацетата целлюлозы [119] и дакрона [217], ковалентно-присоединенной к внутренней поверхности найлоновых трубок [215, 216], к коллагеновым пленкам [214, 218]. Включение таких реакторов в систему кровообращения обезьян бабуинов, человека [212, 219] и собак [214] уже через 0,5—2 ч приводит к практически полному удалению аспарагина из кровотока и резкому снижению иммунной реакции.

Этот же принцип положен в основу применения ферментных реакторов для детоксикации организма. Уреаза, включенная в волокна из триацетата целлюлозы, эффективно снижает уровень мочевины в крови [119]. Иммобилизованная уриказа может быть использована для удаления мочевины из организма пациентов с гиперурикемией [220]. При проверке уриказы, иммобилизованной на стеклянных шариках, в экстракорпоральном шунте, включенном в кровоток собак, оказалось, что происходит быстрое падение уровня мочевины в крови и моче и соответствующее увеличение содержания аллантаина в моче [220]. Трубчатый реактор, содержащий L-фенилаланин-аммиак-лиазу, превращает фенилаланин в транс-коричную кислоту, тем самым уменьшая его высокую концентрацию в организме, наблюдающуюся при фенилкетонурии [221].

Возможно, что некоторые ферменты окажутся полезными при лечении печеночной недостаточности в связи с тем, что при этом в организме накапливаются вредные метаболиты, такие как аммиак, меркаптаны, свободные фенолы и жирные кислоты [213]. Полиферментная система, состоящая из лактатдегидрогеназы, аланиндегидрогеназы и

макромолекулярного производного НАД⁺, включенная в тромборезистентное волокно из триацетата целлюлозы, способна удалять аммиак из крови и синтезировать L-аланин [222]. Фенол из сыворотки крови (используя иммобилизованную на CNBr-активированной сефарозе глюкозилтрансферазу) удалось устранить в опытах *in vitro* и *in vivo* (на кроликах) [213].

Медицинское применение принципов аффинной хроматографии описано пока лишь в единичных работах. Так, альбумин, иммобилизованный на CNBr-активированной агарозе, использован для связывания билирубина из крови или плазмы [223]. Опыты на крысах с экспериментальной желтухой показали, что гемоперфузии через такой гель в течение 1 ч достаточно для удаления билирубина из плазмы [224]. Аналогичный эффект был обнаружен и при лечении желтухи новорожденных обезьян, однако наблюдались некоторые нежелательные биологические последствия гемоперфузии [225, 226].

В заключение отметим, что все возможные медицинские применения иммобилизованных ферментов в настоящее время еще полностью не познаны, хотя уже сейчас могут быть намечены некоторые тенденции в использовании иммобилизованных ферментов при лечении человека. Это прежде всего лечение заболеваний, связанных с врожденной недостаточностью некоторых ферментов, с патологическим накоплением вредных метаболитов, при некоторых функциональных расстройствах. Предстоит еще большая работа по исследованию потенциально активных ферментов и их экспериментальному и клиническому применению, с тем чтобы клиницисты могли иметь в руках разнообразные и специфические средства лечения различных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вольф М., Рансбергер К. (1976) Лечение ферментами, «Мир», М.
2. Tager J. M., Hooghwinkel G. J. M., Daems W. T., eds. (1974) *Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases*, North-Holland, Amsterdam.
3. Desnick R. J., Thorpe S. R., Fiddler M. B. (1976) *Physiol. Rev.* 56, 57—99.
4. Gregoriadis G. (1978) *Nature* 275, 695—696.
5. Chang T. M. S. (1976) in *Methods in Enzymology* (K. Mosbach, ed.), vol. 44, p. 201—218, 676—698, Acad. Press. New York—San Francisco—London.
6. Torchilin V. P., Martinek K. (1979) *Enzyme Microbiol. Technol.* 1, 74—82.
7. Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., Berezin I. V. et al. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 522, 277—283.
8. Торчилин В. П., Максименко А. В., Мартинек К. (1979) *Биоорган. химия* 5, 295—300.
9. Snyder R. D. Jr., Wold F., Bernlohr R. W., Dullum C. et al. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 350, 432—436.
10. Poznansky M. J. (1977) in *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (T. M. S. Chang, ed.), vol. 2, p. 341—354, Plenum Press, New York—London.
11. Gregoriadis G. (1974) in *Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases* (J. M. Tager, G. J. M. Hooghwinkel, W. T. Daems, eds.), p. 131—148, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
12. Bartholeyns J., Moore S. (1974) *Science* 186, 444—445.
13. Mok W., Chen D. E., Mazur A. (1975) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 34, 1458—1460.
14. Bonsel P., Laver M. B., Morris K. S. (1976) *Pat. Germ. N* 2.606706.
15. Bonhard K., Boyson U. (1976) *Pat. Germ. N* 130508.
16. Розенберг Г. Я. (1978) *Докл. АН СССР* 243, 1320—1323.
17. Bartholeyns J., Baudhuin P. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 573—576.
18. Kooistra T., Duursma A., Bouma J. M. W., Gruber M. (1977) *Acta Biol. Med. Germ.* 36, 1763—1776.
19. Winkelhake J. L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1865—1868.
20. Donaguma L. G. (1974) *Progr. Polym. Sci.* 4, 1—25.
21. Ringsdorf H. (1975) *Nachr. Chem. Technol.* 23, 375—377.
22. Вирник А. Д., Хомяков К. П., Скокова И. Ф. (1975) *Усп. химии* 44, 1280—1307.

23. Kopeček J. (1975) *Polym. Med.* 5, 90—102.
24. Kopeček J. (1977) *Polym. Med.* 7, 191—220.
25. Batz H. G. (1977) *Adv. Polym. Sci.* 23, 25—53.
26. Ammon R. (1963) *Enzymologia* 25, 245—251.
27. Ringsdorf H. (1975) *J. Polym. Sci.* 51, 135—153.
28. Eshhar Z., Benacerraf B., Katz D. H. (1975) *J. Immunol.* 114, 871—876.
29. Bernath F. R., Vieth W. R. (1974) in *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Chemistry* (A. Olson, C. Cooney, eds.), p. 157—185, Plenum Press, N. Y.
30. Vieth W. R., Venkatasubramanian K. (1976) in *Methods of Enzymology* (K. Mosbach, ed.), vol. 44, p. 243—263, Acad. Press, New York—San Francisco—London.
31. Dillon J. G., Wade C. W. R., Daly M. H. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* 18, 133—139.
32. Inada I., Shigehisa H., Masahisa O. (1975) *Enzyme* 20, 188—192.
33. Богачева Т. И., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. (1977) *Биохимия* 42, 609—615.
34. Торчилин В. П. (1978) *Биоорг. химия* 4, 566—568.
35. Torchilin V. P., Ilina E. V., Streltsova Z. A., Smirnov V. N. et al. (1978) *J. Biomed. Mater. Res.* 12, 585—590.
36. Hulme B., Hardwicke J. (1968) *Clin. Sci.* 34, 515—529.
37. Pratten M. K., Duncan R., Lloyd J. B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 540, 455—462.
38. И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек, ред. (1976) *Иммобилизованные ферменты*, Изд-во Моск. ун-та, М.
39. Marshall J. J. (1976) *Carbohy. Res.* 49, 389—398.
40. Marshall J. J. (1978) *Trends Biochem. Sci.* 3, 79—83.
41. Abuchowski A., van Es T., Palczuk N. C., Davis F. F. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3578—3581.
42. Marshall J. J., Humphreys J. D. (1979) *J. Appl. Biochem.* 1, 88—94.
43. Liu F.-T., Zinnecker M., Namaoka T., Katz D. H. (1979) *Biochemistry* 18, 690—697.
44. Петров Р. В., Хайтов Р. М. (1979) *Усп. совр. биол.* 88, 307—321.
45. Веремеенко К. Н. (1967) *Протеиназы поджелудочной железы и их применение в клинике*, Здоров'я, Киев.
46. Веремеенко К. Н. (1971) *Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике*, Здоров'я, Киев.
47. Стручков В. И., Григорян А. В., Гостищев В. К., Лохвидский С. В. и др. (1970) *Протеолитические ферменты в гнойной хирургии*, Медицина, М.
48. Толстых П. И. (1978) *Ферменты протеолиза и их ингибиторы в хирургической клинике*. Докт. дис., М.
49. Svensson B. (1973) *Proc. 9th Int. Congress Biochem.* 119, Stockholm.
50. Кинстлер О. Б., Козлов Л. В. (1977) *Биохимия* 42, 1074—1081.
51. Линденбаум Г. М., Миргородская О. А., Москвичев Б. В., Терешин И. М. (1977) *Хим. фарм. ж.* 11, 81—86.
52. Foster R. L. (1975) *Experientia* 31, 772—773.
53. Marshall J. J., Rabinowitz M. L. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 777—779.
54. Marshall J. J., Rabinowitz M. L. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1081—1087.
55. von Specht B. U., Seinfeld H., Brendel W. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1659—1660.
56. von Specht B. U., Brendel W. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 484, 109—114.
57. Линденбаум Г. М., Богачева Т. И., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. и др. (1977) *Прикл. биохим. и микробиол.* 13, 685—691.
58. Иванова Г. П., Миргородская О. А., Панарин Е. Ф., Москвичев Б. В. (1977) *Биоорг. химия* 3, 127—132.
59. Vegarud G., Christensen T. B. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1391—1397.
60. Lasch J. (1976) *Eur. J. Biochem.* 63, 591—598.
61. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) *Биоорг. химия* 2, 1252—1257.
62. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Тищенко Е. Г., Ильина Е. В. и др. (1976) *Биоорг. химия* 2, 1687—1694.
63. Torchilin V. P., Tischenko E. G., Smirnov V. N. (1977) *J. Solid-Phase Biochem.* 2, 19—29.
64. Ginger L. G., Mather A. N. (1976) *Pat. USA*, N 3980772.
65. Линденбаум Г. М. (1978) *Исследование химической модификации некоторых протеолитических ферментов водорастворимыми декстранами*, канд. дис., Л.
66. von Specht B. U., Wahl M., Kolb H. J., Brendel W. W. (1975) *Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.* 213, 242—250.
67. Marshall J. J., Humphreys J. D., Abramson S. L. (1977) *FEBS Letters* 83, 249—252.
68. Geiger B., von Specht B. U., Arnon R. (1977) *Eur. J. Biochem.* 73, 141—147.

69. Куриненко Б. М., Қалачева Н. В., Габдуллина Г. К. (1975) *Биоорг. химия* 1, 483—488.
70. Куриненко Б. М., Беляева М. И., Черепнева И. Е., Виестуре З. А. (1977) *Вопр. онкологии* 23, 94—98.
71. Tam S. C., Blumenstein J., Wong J. T. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2128—2131.
72. Chang J. E., Wong J. T. (1977) *Can. J. Biochem.* 55, 398—403.
73. Blumenstein J., Tam S. C., Chang J. E., Wong J. T. (1978) in *Ninth Annual Red Cross Symposium* (G. A. Jamieson, T. J. Greenroalt, eds.), p. 205—212, Alan R. Liss, N. Y.
74. Tam S. C., Blumenstein J., Wong J. T. (1978) *Can. J. Biochem.* 56, 981—984.
75. Sherwood R. F., Baird J. K., Atkinson T., Wiblin C. N. et al. (1977) *Biochem. J.* 164, 461—464.
76. Davis F. F., Abuchowski A., van Es T., Palczuk N. C. et al. (1979) *Amer. Chem. Soc. Polym. Prepr.* 20, 357—360.
77. Marshall J. J., Rabinowitz M. L. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* 18, 1325—1329.
78. Abuchowski A., McCoy J. R., Palczuk N. C., van Es T. et al. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3582—3586.
79. Vogel R., Trautschold I., Werle E. (1968) *Natural Proteinase Inhibitors*, Acad. Press, N. Y.
80. Haberland G. L., Matis P. (1969) *Neue Aspekte der Trasytol Therapie*, vol. 3, Schattauer Verlag, Stuttgart—New York.
81. Brendel W., Haberland G. L. (1972) *Neue Aspekte der Trasytol Therapie*, vol. 5, Schattauer Verlag, Stuttgart—New York.
82. Haberland G. L., Lewis D. H. (1973) *Neue Aspekte der Trasytol Therapie*, vol. 6, Schattauer Verlag, Stuttgart—New York.
83. Tschirkov F., Greifenstein J., Einsenbach J., Rötter P. et al. (1972) *Med. Welt.* 23, 1838—1843.
84. Андрека В., Шипош Е., Алекси М. (1976) *Венгерск. фармотерапия* 3, 94—100.
85. Руда, Зыско А. П. (1977) *Инфаркт миокарда*, М.
86. Fritz H., Oppitz K. H., Meckl D., Kemkes B. et al. (1969) *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1541—1550.
87. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю. (1977) *Биохимия* 42, 1237—1243.
88. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю. (1978) *Биохимия* 43, 880—886.
89. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю. и др. (1979) *Биохимия* 44, 2033—2038.
90. Oduya C. E., Levin Y., Erdös E. G., Robinson J. G. (1978) *Biochem. Pharmacol.* 27, 173—179.
91. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю. (1979) *Биохимия* 44, 350—358.
92. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю., Митюшина Г. В. (1980) *Биохимия* 45, 683—686.
93. Lariopova N. I., Sakharov I. Yu., Kazanskaya N. F., Zhuravlyov A. G. et al. (1980) in *Future Directions for Enzyme Engineering* (L. B. Wingard, I. V. Berezin, A. A. Klyosov, eds.), p. 241—255. Plenum Press, N. Y.
94. Armstrong K. J., Noal M. W., Stouffer J. E. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 354—360.
95. Katzen H. M., Vlahakes G. I. (1973) *Science* 179, 1142—1143.
96. von Specht B. U., Kolb H. J., Renner R., Hepp K. D. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 231—238.
97. Suzuki F., Daikuhara Y., Ono M., Takeda Y. (1972) *Endocrinology* 90, 1220—1230.
98. Galloway J. A., Root M. A. (1972) *Diabetes* 21, 631—648.
99. Shigetaya Y., Shichiri M., Okada A., Karasaki K. (1972) *Endocrinology* 91, 320—322.
100. Chytrý V., Vrána A., Kopeček J. (1978) *Makromol. Chem.* 179, 329—336.
101. Sakamoto Y., Akanuma Y., Kosaka K., Jeanrenaud B. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 498, 102—113.
102. Torchilin V. P., Il'ina E. V., Mazaev A. V., Lebedev B. S. et al. (1978) *J. Solid-Phase Biochem.* 2, 187—193.
103. Торчилин В. П., Тищенко Е. Г., Ильина Е. В. и др. (1977) *Авт. свид. № 243336/05*.
104. Cuatrecasas P. (1969) *Biochemistry* 63, 450—457.
105. Chang T. M. S. (1972) *Artificial Cells*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield.
106. Chang T. M. S. (1973) *Biomed. Eng.* 8, 334—339.
107. Chang T. M. S. (1975) *J. Kidney Int.* 7, S 387—S 392.
108. Chang T. M. S. (1973) *Enzyme* 14, 95—104.
109. Poznansky M. J., Chang T. M. S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 334, 103—115.
110. Siu Chong E. D., Chang T. M. S. (1974) *Enzyme* 18, 218—239.

111. Chang T. M. S. (1977) in *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (T. M. S. Chang, ed.), vol. 1, p. 147—162, 281—295, Plenum Press, New York—London.
112. Chang T. M. S., Loa S. K. (1970) *Physiologist* 13, 70—74.
113. Gardner D. L., Emmerling D. C., Williamson K. D., Hassler C. R. et al. (1973) *Ann. Conf. Eng. Med. Biol.* 26, 267.
114. Gardner D. L., Emmerling D. C., Williamson K. D., Baytos W. S. et al. (1975) *Kidney Intern.* 7, S—393.
115. Gardner D. L., Emmerling D. C. (1977) in *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (T. M. S. Chang, ed.), vol. 1, p. 163—170. Plenum Press, New York—London.
116. Chang T. M. S. (1972) *J. Dental. Res.* 51, 319—321.
117. Mori T., Sato T., Matuo Y., Tosa T. et al. (1972) *Biotechnol. Bioeng.* 14, 663—673.
118. Mori T., Tosa T., Chibata I. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 321, 653—661.
119. Salmons M., Saronio C., Bartosek I., Vecchi A. et al. (1974) in *Insolubilized Enzymes* (M. Salmons, C. Saronio, S. Garattini, eds.), p. 189—200, Raven Press, N. Y.
120. Siu Chong E. D., Chang T. M. S. (1977) in *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (T. M. S. Chang, ed.), vol. 1, p. 105—120, Plenum Press, New York—London.
121. Chang T. M. S. (1976) in *Methods in Enzymology* (K. Mosbach, ed.), vol. 44, p. 201—218, 676—698, Acad. Press, New York—London.
122. Chang T. M. S. (1976) *J. Bioeng.* 1, 25—32.
123. Chang T. M. S. (1975) in *Socio-economic and Ethical Implications of Enzyme Engineering* (C.-G. Heden, ed.), p. 17—18, International Federation of Institutes for Advanced Studies, Stockholm.
124. Campbell J., Chang T. M. S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 397, 101—109.
125. Campbell J., Chang T. M. S. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 562—569.
126. Cousineau J., Chang T. M. S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 24—31.
127. Gregoriadis G. (1976) in *Methods in Enzymology* (K. Mosbach, ed.), vol. 44, p. 218—227, 698—709, Acad. Press, New York—San Francisco—London.
128. Finkelstein M., Weissmann G. (1978) *J. Lipid Res.* 19, 289—303.
129. Fishman Y., Citri N. (1975) *FEBS Letters*, 60, 17—20.
130. Dapergolas G., Neerunjun E. D., Gregoriadis G. (1976) *FEBS Letters* 63, 235—239.
131. Kataoka T., Williamson J. R., Kinsky S. C. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 298, 158—179.
132. Reynolds G. D., Baker H. J., Reynolds R. H. (1978) *Nature* 275, 754—755.
133. Steger L. D., Desnick R. J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 464, 530—546.
134. Braidman I., Gregoriadis G. (1976) *Biochem. Soc. Trans.* 4, 259—261.
135. Colley C. M., Ryman B. E. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 451, 417—425.
136. Patel H. M., Ryman B. E. (1974) *Biochem. Soc. Trans.* 2, 1014—1017.
137. Gregoriadis G., Ryman B. E. (1972) *Eur. J. Biochem.* 24, 485—491.
138. Tyrrel D. A., Ryman B. E., Keeton B. R., Dubowitz V. (1976) *Br. Med. J.* 2, 88—91.
139. Cohen C. M., Weissmann G., Hoffstein S., Awasthi Y., Srivastava S. K. (1976) *Biochemistry* 15, 452—460.
140. Sessa G., Weissmann G. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3295—3301.
141. Magee W. E., Goff C. W., Schoknecht J., Smith M. D. et al. (1974) *J. Cell. Biol.* 63, 492—504.
142. Gregoriadis G., Ryman B. E., (1972) *Biochem. J.* 129, 123—133.
143. Gregoriadis G., Putnam D., Louis L., Neerunjun E. D. (1974) *Biochem. J.* 140, 323—330.
144. Eytan G., Matheson M. J., Racker E. (1975) *FEBS Letters* 57, 121—125.
145. Redwood W. R., Patel B. C. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 363, 70—85.
146. Fendler J. H., Romero A. (1977) *Life Sciences* 20, 1109—1120.
147. McDougall I. R., Dunnick J. K., Goris M. L., Kriss J. P. (1975) *J. Nucl. Med.* 16, 488—491.
148. Juliano R. L., Stamp D. (1975) *Biochim. Biophys. Res Commun.* 63, 651—658.
149. Jonah M. M., Cerny E. A., Rahman Y. E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 401, 336—348.
150. Magee W. E., Talcott M. L., Straub S. X., Vriend C. Y. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 451, 610—618.
151. Caride V. J. (1977) *Science* 198, 735—738.
152. Gregoriadis G., Neerunjun B. D. (1974) *Eur. J. Biochem.* 47, 179—185.
153. Gregoriadis G. (1976) *New Engl. J. Med.* 295, 704—710, 765—770.

154. Dunnick J. K., McDougall I. R., Aragon S., Goris M. L. et al. (1975) *J. Nucl. Med.* 16, 483—487.
155. Deshmukh D. S., Bear W. D., Wishiewski H. M., Brockerhoff H. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 328—334.
156. Торчилин В. П., Бердичевский В. Р., Гольдмахер В. С., Смирнов В. Н. и др. (1979) *Бюлл. экспер. биол. мед.* 8, 160—161.
157. Papaioannopoulos D., ed. (1978) *Liposomes and their Uses in Biology and Medicine*, p. 308, *Ann. New York Acad. Sci.*, N. Y.
158. Neerunjun E. D., Gregoriadis G. (1976) *Biochem. Soc. Trans.* 4, 133—134.
159. Madeira V. M. C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 499, 202—211.
160. Belchetz P. E., Braidman I. P., Crawley J. C. W., Gregoriadis G. (1977) *The Lancet*, 116—117.
161. Ang E., Glew R., Ihler G. (1977) *Exp. Cell. Res.* 104, 430—434.
162. Ihler G., Glew R., Schnure F. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2663—2666.
163. Ihler G., Glew R. (1977) in *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (T. M. S. Chang, ed.), vol. 1, p. 219—226, Plenum Press, New York—London.
164. Updike S. J., Wakamiya R. T., Lightfoot E. N. (1976) *Science* 193, 681—683.
165. Fiddler M. B., Desnick R. S. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 397—408.
166. Desnick R. J., Fiddler M. B., Thorpe S. R., Steger L. D. (1977) in *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (T. M. S. Chang, ed.), vol. 1, p. 227—244, Plenum Press, New York—London.
167. Dale G. L., Beutier E. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4672—4674.
168. Ringsdorf H. (1975) *J. Polym. Sci.* 51, 135—153.
169. Gregoriadis G. (1977) *Nature* 265, 407—411.
170. Goldberg E. P. (1978) in *Polymeric Drugs*, p. 239—262, Acad. Press, New York—San Francisco—London.
171. Pitha J. (1978) *Eur. J. Biochem.* 82, 285—292.
172. Hughes R. C., Sharon N. (1978) *Nature* 274, 637—638.
173. Morell A. G., Gregoriadis G., Scheinberg I. H., Hickman J. et al. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1461—1467.
174. Ashwell G., Morell A. B. (1974) in *Advances in Enzymology* (A. Meister, ed.), vol. 41, p. 99—128, John Wiley and Sons, New York.
175. Pricer Jr. W. E., Ashwell G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 4825—4833.
176. Yu S. C., Gan J. C. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 477—485.
177. Yu S. C., Gan J. C. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 107—115.
178. Rogers J. C., Kornfeld S. T. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 622—629.
179. Schmer G., Holcenberg J. S., Roberts J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 538, 397—405.
180. Wilson G. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2070—2072.
181. Marsh J. W., Denis J., Wriston J. C. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7678—7684.
182. Stockert R. J., Morell A. G., Scheinberg I. H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 988—993.
183. Steer C. J., Furbish F. S., Barranger J. A., Brady R. O. et al. (1978) *FEBS Letters* 91, 202—205.
184. de Dève C. et al. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 23, 2495—2531.
185. Boldt D. H., Spevkart S. F., Richards R. L., Alving C. R. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 208—214.
186. Alving C. R., Joseph K. C., Wistar R. (1974) *Biochemistry* 13, 4818—4824.
187. Bussian R. W., Wriston J. C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 471, 336—340.
188. Surolija A., Bachhawat B. K. (1977) *Biochim., Biophys. Acta* 497, 760—765.
189. Rowland G. F., O'Neill G. J., Dacies D. A. L. (1975) *Nature* 255, 488—489.
190. Weissmann G., Bloomgarden D., Kaplan R., Cohen C. et al. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 88—92.
191. Марголис Л. Б., Дорфман Н. А. (1977) *Бюлл. экспер. биол. мед.* 1, 53—57.
192. Gregoriadis G., Neerunjun E. D. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 537—544.
193. Торчилин В. П., Гольдмахер В. С., Смирнов В. Н. (1978) *Биоорг. химия* 4, 1560—1562.
194. Torchilin V. P., Goldmacher V. S., Smirnov V. N. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 983—990.
195. Торчилин В. П., Бан Ан Ко, Бердичевский В. Р., Локе Э. и др. (1979) *ДАН СССР* 246, 746—749.
196. Folkman J., Long D. M. (1964) *J. Surg. Res.* 4, 139—142.
197. Langer R., Folkman J. (1976) *Nature* 263, 797—800.
198. Langer R., Folkman J. (1978) in *Polymeric Delivery Systems Midland Macromolecular Monograph* (H. G. Elias, ed.), Seris 5, 175—196.

199. Кильдеева Н. Р., Казанская Н. Ф., Вирник А. Д. (1979) Изв. вузов. Сер. Химия и хим. технол. 22, 225—229.
200. Вирник А. Д., Кильдеева Н. Р., Толстых П. И., Василькова З. Ф. и др. (1979) Авт. свид. № 700138.
201. Стручков В. И., Григорян А. В., Гостищев В. К., Толстых П. И. и др. (1979) Тез. 3^{го} Всесоюз. симпоз. по медицинской энзимологии, с. 138—139, Астрахань.
202. Григорян А. В., Толстых П. И., Василькова З. Ф., Арутюнян Б. Н. и др. (1979) в кн. Асептика и антисептика, с. 73—76. М.
203. Torchilin V. P., Tischenko E. G., Smirnov V. N., Chazov E. I. (1977) J. Biomed. Mater. Res. 11, 223—235.
204. Торчилин В. П., Бобкова А. С., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биоорг. химия 2, 116—124.
205. Чазов Е. И., Мазаев А. В., Торчилин В. П., Лебедев Б. С. и др. (1977) Кардиология 17, 139—142.
206. Chazov E. I., Mazaev A. V., Torchilin V. P., Lebedev B. S. et al. (1978) Thromb. Res. 12, 809—814.
207. Торчилин В. П., Лебедев Б. С., Мазаев А. В., Кухарчук В. В. и др. (1976) Кардиология 16, № 9, 102—105.
208. Козлов Е. А., Петрий О. П. (1978) Вopr. мед. химии, 723—733.
209. Bernath F. R., Olanoff L. S., Vieth W. R. (1977) in Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins (T. M. S. Chang, ed.), vol. 1, p. 351—375, Plenum Press, New York—London.
210. Cooney D., Weetall H., Long E. (1975) Biochem. Pharmacol. 24, 503—515.
211. Hýden H. (1971) Arzneimittel—Forsch 21, 1671—1675.
212. Sampson D., Han T., Hersh L. S., Murphy G. P. (1974) J. Surg. Oncol. 6, 39—48.
213. Brunner G., Losgen H. (1978) in Enzyme Engineering (E. K. Pye, H. H. Weetall, eds.), vol. 3, p. 391—396, Plenum Press, New York—London.
214. Olanoff L. S., Bernath F. R., Venkatasubramanian K. (1975) Amer. Chem. Soc. Polym. Prepr. 16, 203—208.
215. Horvath C., Sazdi A., Woods J. S. (1973) J. Appl. Physiol. 34, 181—187.
216. Allison J. P., Davidson L., Gutierrez-Hartman A., Kitto G. B. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 66—73.
217. Ko R. J. C., Hersh L. S. (1976) J. Biomed. Mat. Res. 10, 249—258.
218. Olanoff L. S. (1975) Trans. Amer. Soc. Art. Int. Organs 21, 156—164.
219. Sampson D., Han T., Hersh L. S. (1972) Medical Primatology 11, 134—141.
220. Venter J. C., Venter B. R., Dixon J. E., Kaplan N. O. (1975) Biochem. Med. 12, 79—91.
221. Pedersen H., Horvath C., Ambrus C. M. (1978) Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 20, 559—569.
222. Dioguardi N., Marconi W., Prosperi G. (1974) Proc. 6th Int., Symp. on Clin. Enz., p. 297—306, N. Y.
223. Plotz P. H., Berk P. D., Scharschmidt B. F., Gordon J. K., Vergalla J. (1974) J. Clin. Invest. 53, 778—785.
224. Scharschmidt B. F., Plotz P. H., Berk P. D., Waggoner J. G. et al. (1974) J. Clin. Invest. 53, 786—795.
225. Scharschmidt B. F., Martin J. F., Shapiro L. J. et al. (1975) Gastroenterology 69, 864.
226. Scharschmidt B. F., Martin J. F., Plotz P. H., Shapiro L. J. et al. (1978) in Enzyme Engineering (E. K. Pye, H. H. Weetall, eds.), vol. 3, p. 427—429, Plenum Press, New York—London.