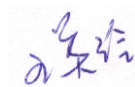


На правах рукописи



Ван Мэйлин

**Разработка борсодержащих мультифункциональных  
наноконструкций на основе модифицированных форм  
альбумина для тераностики злокачественных опухолей**

*1.4.9 - Биоорганическая химия*

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой  
степени кандидата химических наук

Новосибирск - 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном  
учреждении науки Институте химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН.

**Научный руководитель: Сильников Владимир Николаевич,  
д.х.н.**

**Официальные оппоненты:**

Лузина Ольга Анатольевна, д.х.н., Федеральное  
государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский  
институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Кичкайло Анна Сергеевна, д.м.н., Федеральный  
исследовательский центр «Красноярский научный центр СО  
РАН»

Купрюшкин Максим Сергеевич, к.х.н., Федеральное  
государственное бюджетное учреждение науки Институт  
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится 14 февраля. в 10:00 часов на заседании  
диссертационного совета ИХБФМ 02.01 при Институте химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:  
630090, г. Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института  
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а  
также [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан "     "     2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

к.х.н

Пестряков П.Е.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Несмотря на достигнутый за последние годы огромный успех в лечении пациентов с раком, ряд онкологических заболеваний, в первую очередь, злокачественные опухоли мозга до сих пор считаются неизлечимыми в связи с быстрой прогрессией, активным ангиогенезом, интенсивной инвазией и резистентностью опухолей. В связи с этим активно изучаются новые стратегии избирательного ингибирования критических стадий опухолевой прогрессии. Существует три терапевтических стратегии лечения рака: хирургия, химиотерапия и лучевая терапия. В качестве более эффективной стратегии терапии наиболее агрессивных опухолей в последнее десятилетие все большее внимание привлекает комбинация химиотерапии с бор-нейтронзахватной терапией (БНЗТ).

БНЗТ – это терапия рака, основанная на способности атомов  $^{10}\text{B}$  генерировать  $\alpha$ -частицы, которые пересекают ткани, в которых  $^{10}\text{B}$  накапливается, не повреждая окружающие здоровые ткани, после облучения тепловыми нейтронами низкой энергии. Однако внедрение БНЗТ технологий в практическую медицину сдерживается некоторыми нерешенными проблемами, в первую очередь, отсутствием эффективных методов управляемой доставки борсодержащих препаратов к биологическим мишеням, а также контроля эффективности, продолжительности и последствий воздействия их на мишень. Очевидно, что идеальные мультифункциональные наноконструкции для БНЗТ должны обеспечивать высокую плотность посадки борсодержащих молекул, эффективно доставлять препарат к месту воздействия на опухоль с минимальным неспецифическим захватом, обеспечивать, в случае применения комбинированной терапии, высвобождение лекарства после доставки, быть биосовместимыми, а также обеспечивать высокую чувствительность обнаружения опухоли (визуализации) и возможность мониторинга лечения.

Разработка таргетных борсодержащих препаратов для комбинированной БНЗТ возможна благодаря множественным

генетическим и эпигенетическим изменениям, происходящим при онкотрансформации и приводящим к изменениям протеомного профиля раковой клетки. Изменение типа, числа и расположения рецепторов приводит к образованию уникального топографического профиля поверхности клеток. Этот поверхностный профиль может являться молекулярным адресом для доставки терапевтических конструкций с помощью адресующих лигандов, в роли которых могут выступать модифицированные формы альбумина. Считается, что пролонгированное время циркуляции терапевтических наноконструкций на основе альбумина дает возможность использовать сосудистые дефекты солидных опухолей через феномен, известный как эффект повышенной проницаемости и удерживания (накопления) (EPR-эффект, Enhanced Permeability and Retention) для пассивного накопления препарата в злокачественных опухолях [Yu, X., et al. 2017; Hirakawa, N., et al. 2021; Olajubutu O., et al. 2023]. Кроме того, аккумуляция наночастиц альбумина в опухолевых клетках может быть обусловлена транцитозом в интерстициальное пространство опухоли, который обеспечивается специфическим взаимодействием с рецепторами, уровень экспрессии которых повышен у раковых клеток. Сообщалось, что SPARC (секретируемый кислый и богатый цистеином белок) сверхэкспрессируется в ряде опухолей и способствует прогрессии опухоли, что привлекает внимание для рассмотрения потенциальной терапевтической ценности данного рецептора [Pan K. Et al. 2021]. Таким образом, разработка на основе модифицированных форм альбумина подходов к объединению в одной структуре как химиопрепарата, так и борсодержающего кластера, представляет собой актуальную задачу, поскольку ее решение приведет к получению на основе транспортного белка крови инновационных multifunctional наноконструкций, способных совмещать длительную циркуляцию, направленность на злокачественную опухоль, а также обеспечит возможность их прижизненной визуализации (диагностическая функция), контролируемое и своевременное высвобождение терапевтических молекул, способных активировать различные механизмы гибели опухолевых клеток.

**Цель данной работы** – разработка на основе сывороточного альбумина человека (HAS) подходов к получению борсодержащих мультифункциональных наноконструкций для тераностики рака, доставку которых можно будет отслеживать методами флуоресцентной/магнитно-резонансной томографии на ядрах  $^{19}\text{F}$ , и которые будут инициировать различные взаимодополняющие формы клеточной гибели: посредством запрограммированного высвобождения в клетках мишени химиотерапевтического препарата – антиметаболита нуклеинового обмена (гемцитабина)/антимитотического лекарственных препаратов (монометилауристатинов MMAE и MMAF), и наведения ионизирующего излучения на мишень при бинарной лучевой терапии.

**Задачи**, на решение которых было направлено настоящее исследование:

1) разработка подходов к получению мультифункциональных борсодержащих препаратов для тераностики злокачественных опухолей, снабженных структурными элементами, которые обеспечат молекулярную мультимодальную визуализацию злокачественных областей и активацию различных механизмов гибели в них опухолевых клеток;

2) оценка прямого цитотоксического эффекта мультифункциональных борсодержащих препаратов на опухолевые клетки различного генезиса и анализ клеточной пролиферации после облучения.

**Научная новизна.** Впервые сконструированы и охарактеризованы физико-химическими методами различные варианты тераностиков на основе альбумина, сочетающие элементы структуры, необходимые для проведения бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ) и химиотерапии и позволяющие визуализировать полученные конъюгаты *in vitro* и *in vivo*. В составе конструкций использованы в различных комбинациях следующие группы: химиотерапевтические (аналоги гемцитабина или ауристатинов MMAE и MMAF); кластеры бора (клозо-додекаборат, и бис(дикарболид) кобальта) и метки для визуализации *in vivo* или *in*

*vitro* (сульфо- $\text{Cu5}$ ,  $\text{Cu7}$  или атомы фтора). Вариативность конструкций достигнута благодаря использованию полифункционального линкера – тиолактона гомоцистеина. Изучена цитотоксичность полученных конъюгатов.

**Теоретическая значимость.** Не смотря на обилие публикаций, касающихся противораковых терапевтических конструкций на основе альбумина, практически нет работ, посвященных разработке ковалентных конъюгатов альбумина, совмещающих химиотерапию, БНЗТ и возможность визуализации. Кроме того, если исключить работы задействующие антитела, крайне мало публикаций, посвященных оптимизации терапевтических конструкций, содержащих ауристатины.

**Практическая значимость.** Полученные в данной работе конъюгаты на основе альбумина представляют собой терапевтические агенты двойной природы, которые потенциально могут быть использованы в качестве тераностиков при терапии раковых опухолей. Учитывая возможность использования данных конструкций в рамках БНЗТ, они будут полезны при терапии глиом. Учитывая использование в качестве основополагающего блока человеческого сывороточного альбумина, результаты данной работы имеют вклад в персонализированную терапию опухолей.

#### **Методология и методы исследования.**

Методология получения мультифункциональных наноконструкций для тераностики злокачественных опухолей включает:

а) разработку лабораторной методики получения мультифункциональной наноконструкции для тераностики злокачественных опухолей;

б) разработку Программы и Методики (ПиМ) экспериментальных исследований качества мультифункциональных наноконструкций и промежуточных продуктов синтеза с помощью физико-химических методов исследования (гель-электрофорез, электронная и флуоресцентная спектроскопии, спектроскопия, ЯМР  $^{19}\text{F}$ ,  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , ИК, масс-спектрометрия MOLDI-TOTOF-MS, АЭС-ИСП);

в) наработку образцов и проведение контроля качества мультифункциональной наноконструкции для тераностики злокачественных опухолей в соответствии с ПИМ;

г) оценку прямого цитотоксического эффекта мультифункциональных наноконструкций для тераностики злокачественных опухолей *in vitro* на опухолевых клетках различного генеза (на клетках линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) и клетках линии T98G (мультиформная глиобластома человека)).

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. В условиях, приближенных к физиологическим, происходит N-гомоцистеинилирование альбумина, меченного по Cys34 флуоресцентной меткой, производными тиолактона гомоцистеина, содержащими магнитно-резонансную метку (ядра <sup>19</sup>F). Последующая реакция «тиол-клик» химии сульфгидрильных групп остатков гомоцистеина, введенных в процессе N-гомоцистеинилирования, с малеимидным производным терапевтических агентов обеспечивает получение мультифункциональной наноконструкции для БНЗТ.

2. К получению борсодержащих мультифункциональных наноконструкций, которые обеспечивают молекулярную мультимодальную визуализацию злокачественных областей и комбинированное воздействие на опухолевые клетки, приводит постсинтетическая селективная модификация остатка Cys-34 и остатков лизина HSA следующими элементами: (1) флуорофора Cy5/Cy7 для оптической томографии (реакция Cys-34 с малеимидным производным красителя); (2) терапевтического блока (химеотерапевтический агент – антимитотические лекарственные препараты, которые связываются с микротрубочками и ингибируют образование митотического веретена (монометилауристатин ММАЕ и ММАF), агент для БНЗТ - бис(дикарболид) кобальта, либо их комбинация -ингибитор нуклеинового обмена гемцитабин, функционализированный по экзоциклической аминогруппе клозо-додекаборатом).

3. Снижение пролиферации клеток глиобластомы человека T98G после облучения эпитеральными нейтронами

свидетельствуют в пользу того, что сывороточный альбумин человека может рассматриваться в качестве кандидата на роль белка-транспортера в системах доставки борсодержащих препаратов для БНЗТ.

4. Высокую плотность посадки борсодержащих молекул на белок-транспортер можно осуществить путем N-гомоцистеинилирование альбумина, меченного по Cys34 флуоресцентной меткой, производными тиолактона гомоцистеина, содержащими бис(дикарболид) кобальта и последующей реакцией «тиол-клик» химии сульфгидрильных групп остатков гомоцистеина, введенных в процессе N-гомоцистеинилирования, с малеимидным производным гемцитабина, функционализированного по экзоциклической аминогруппе клозо-додекабором.

#### **Степень достоверности результатов.**

Достоверность полученных результатов обеспечена тщательностью выполнения экспериментов и воспроизводимостью их результатов, а также использованием современных физико-химических методов для анализа состава и установления структур всех конструкции.

#### **Личный вклад соискателя.**

Лично автором осуществлены: дизайн, синтез и очистка всех белковых конструкций и тиолактона N-трифторацетилгомоцистеина, получение электронных спектров поглощения, проведение электрофореза и интерпретация результатов физико-химических анализов полученных соединений, подготовка научных статей к публикации, представление докладов на конференциях. Автор принимал участие в планировании и обсуждении результатов экспериментов, связанных с изучением биологической активности полученных соединений.

Малеимидные аналоги гемцитабина, тиолактон гомоцистеина, содержащий бис(дикарболид) кобальта предоставлены сотрудниками Лаборатории органического синтеза ИХБФМ СО РАН (В.И. Расколуновой и И.А. Москалевым). MALDI-TOF и ESI масс-спектры получены в Центре масс-спектрометрического анализа (ИХБФМ СО РАН). ИК и ЯМР спектры получены в центре спектральных исследований (НИОХ СО РАН), анализ

цитотоксичности *in vitro* проделан сотрудниками ИХБФМ СО РАН (О.Д. Захаровой и М.А. Дымовой), эксперименты БНЗТ проделаны сотрудниками ИЯФ СО РАН, атомно-эмиссионная спектроскопия сделана И.А. Касатовой (ИЯФ СО РАН). Эксперименты *in vivo* сотрудниками ИЦиГ СО РАН.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждений, выводов и списка литературы, который включает 168 источников. Общий объем работы 129 страниц, включая 40 рисунков и 5 таблиц.

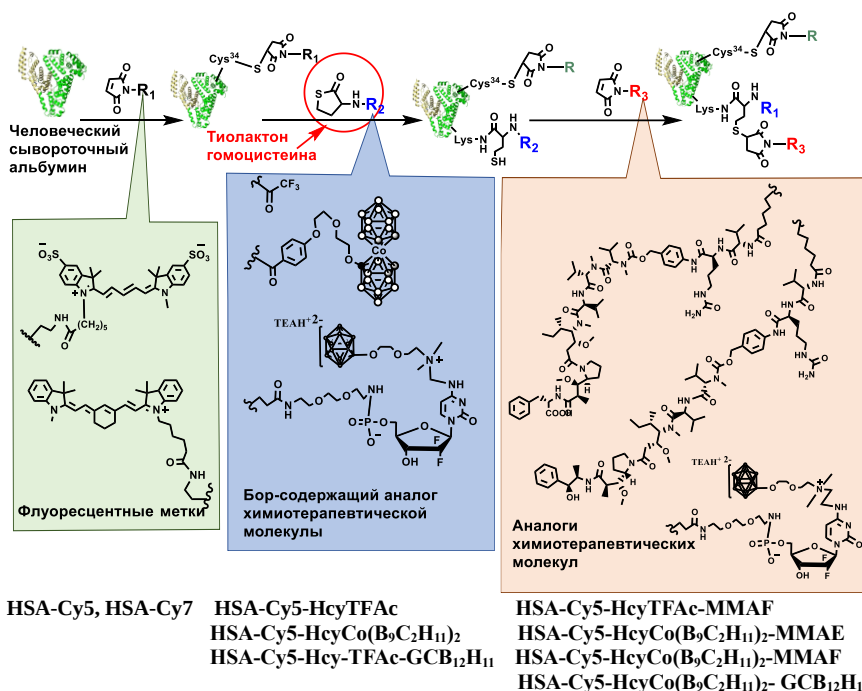
Работа выполнена при поддержке Договора № 24.01.22-ЛОрС от 24.01.2022 г. между Фармацевтической компании Suzhou Jianhua, Ltd. (КНР) и ИХБФМ СО РАН, РФ (грант №19-74-20123).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Общая стратегия синтеза конъюгатов альбумина**

В основе конструкции находится молекула человеческого сывороточного альбумина (HAS), одновременно выполняющая функцию носителя для остальных блоков конструкции, и функцию адреса, обеспечивающего специфичность нацеливания конструкции на раковые клетки. Блоки двух видов (терапевтические и сигнальные молекулы) вводятся в структуру HAS с применением «тиол-клик» химии сульфгидрильных групп имеющих в структуре HAS (-SH группа остатка Cys-34), а также образующихся в результате сайт-специфического ацилирования остатков лизинов N-ацилированного тиолактона гомоцистеина. Гомоцистеиновый фрагмент служит в качестве полифункционального переходника, который, с одной стороны, обеспечивает различные варианты комбинаций терапевтических и сигнальных блоков, с другой стороны, является структурой, внедряемой в альбумин без нарушения его функционирования.

На рисунке 1 представлена общая стратегия получения мультифункциональных конструкций на основе альбумина.



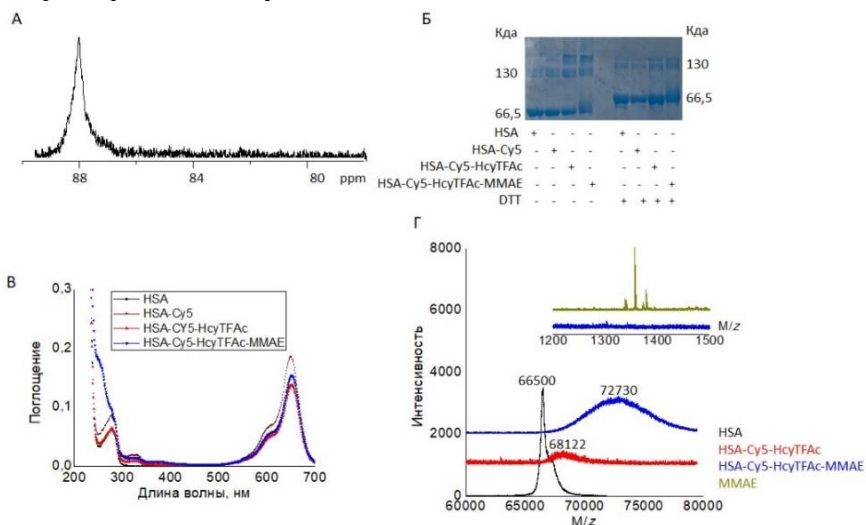
**Рис. 1.** Общая схема синтеза конъюгатов на основе альбумина для терапии раковых опухолей.

## 2. Конъюгаты альбумина, содержащих флуоресцентные красители сульфо-Су5/Су7, трифторацетилгомоцистеин (HTLTFAc), ауристин MMAF/MMAE, гемцитабин, содержащий борный кластер (GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>)

На первой стадии синтеза флуоресцентный краситель вводится по единственной свободной сульфгидрильной группе остатка Cys34. Следует отметить, что коммерческие препараты HAS содержат только 30-40% свободных сульфгидрильных групп. Выбор красителя определялся исходя из используемых в тех или иных экспериментах детектирующих устройств (Cy5 и Cy7 для экспериментов *in vitro* и *in vivo*, соответственно). Последующая обработка полученного флуоресцентно меченного HSA трифторацелированным по аминогруппе тиолактоном гомоцистеина приводит к ацилированию

3-4 определенных остатков лизина с высвобождением сульфгидрильных групп. Последние, в свою очередь, были задействованы для введения терапевтических молекул, имеющих в своей структуре малеимидные остатки.

Структуры всех целевых конъюгатов, а также промежуточных продуктов, были подтверждены набором физико-химических методов анализа. На рисунке 2 на примере конъюгата HSA-Cy5-HcyTFac-MMAE, приведены основные физико-химические характеристики полученных конъюгатов.



**Рис. 2.** Характеристики конъюгата HSA-Cy5-HcyTFac-MMAE. А:  $^{19}\text{F}$ -ЯМР в дейтерированном PBS, pH 7,4; Б: электрофорез в 7% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS); В: электронные спектры; Г: данные MALDI-ToF.

Судя по данным гелеэлектрофореза (рис. 2Б), масса альбумина при модификации меняется в большую сторону, а также, уже на стадии гомоцистеинилирования, происходит накопление олигомерных форм альбумина, что может быть объяснено межмолекулярной сшивкой сульфгидрильных групп в составе белка, образующихся при раскрытии тиолактоновых фрагментов гомоцистеина. Исходя из данных MALDI ToF (рис. 2Г), в этой серии

синтезов произошло присоединение к молекуле белка, в среднем, 0,4 остатков красителя Cy5, 4 остатков HTLTFAc и 3,5 молекул пептида MMAE. Полная степень очистки итогового конъюгата от непрореагировавшего пептида подтверждается отсутствием сигналов в MALDI ToF конечного образца в области 1000-2000 Да (рис. 2Г, вставка). Присоединение HTLTFAc так же было подтверждено методом  $^{19}\text{F}$  ЯМР (рис. 2А). Наличие в молекуле итогового конъюгата красителя Cy5 подтверждается данными электронной спектроскопии (рис. 2В). В случае конъюгата HSA-Cy5-Hcy-TFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub> количество присоединённых борсодержащих аналогов гемцитабина (GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>) было дополнительно подтверждено путем определения общего количества бора методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой.

С целью оценки влияния трифторацетилгомоцистеинового линкера терапевтический пептид MMAF был также присоединен к флюоресцентно меченному альбумину путем его прямого присоединения по аминокетам лизина (конъюгат HSA-Cy5-MMAF).

В таблице 1 приведено количество модифицированных остатков, содержащихся в синтезированных конъюгатах, содержащих ауристатины, гемцитабин, красители сульфо-Cy5 или Cy7 и трифторацетилированный гомотистеин.

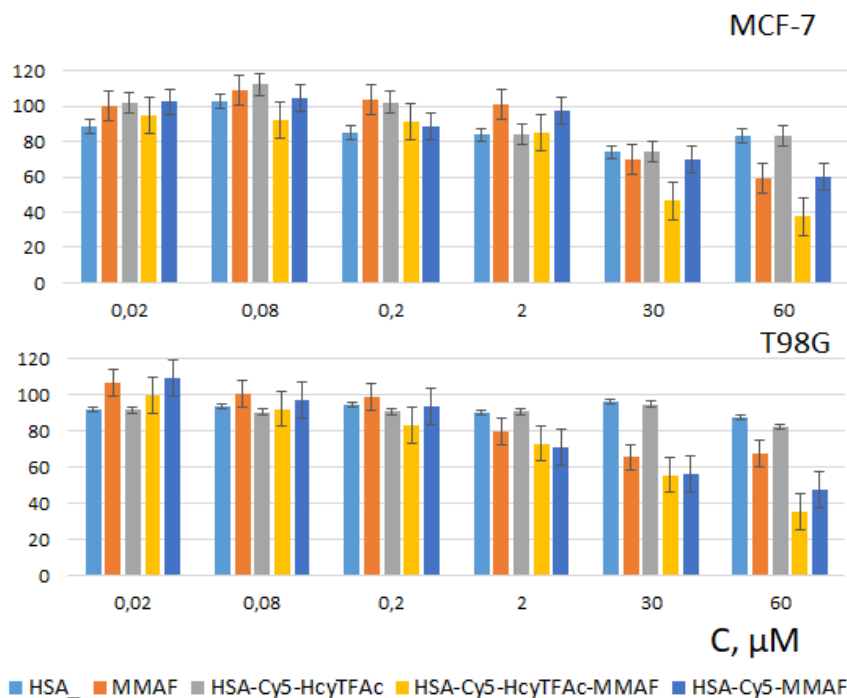
**Таблица 1** Степень модификации молекул HSA терапевтическими молекулами.

| Конъюгат                                      | Количество<br>HcyTFAc | Количество<br>терапевтического агента |
|-----------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| HSA-Cy5-MMAF                                  | 0                     | 5                                     |
| HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF                          | 4                     | 2,5                                   |
| HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE                          | 4                     | 3,5                                   |
| HSA-Cy7-HcyTFAc-MMAF                          | 4                     | 3,3                                   |
| HSA-Cy7-HcyTFAc-MMAE                          | 4                     | 2                                     |
| Cy5-HcyTFAc-GCB <sub>12</sub> H <sub>11</sub> | 2,5                   | 1,5                                   |
| Cy5-HcyTFAc-GCB <sub>12</sub> H <sub>17</sub> | 2,5                   | 1,5                                   |

На начальном этапе исследований было проведено сравнение

цитотоксичности конъюгата HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF с конъюгатом HSA-Cy5-MMAF, полученным без использования промежуточного линкера.

Результаты исследования цитотоксичности свидетельствуют о том, что конъюгат, содержащий остатки трифторацетилгомоцистеина, обладает большей токсичностью в отношении клеток рака молочной железы и глиобластомы человека, чем конъюгат полученный прямым присоединением терапевтического пептида к белку, несмотря на то что в последнем конъюгате содержится в 2 раза больше присоединенных пептидов (рис. 3).

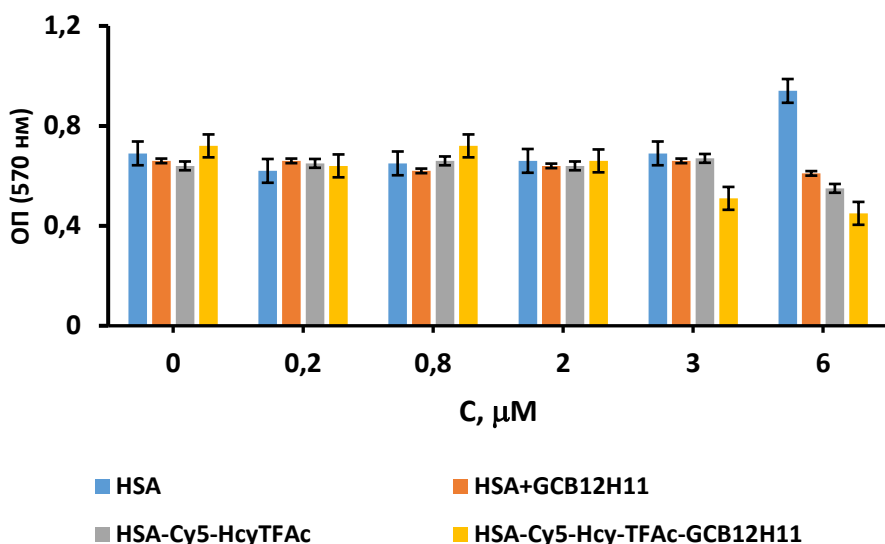


**Рис. 3.** Исследование цитотоксичности HSA-Cy5-HcyTFAc, HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF и HSA-Cy5-MMAF на линии клеток рака молочной железы человека MCF 7 и линии клеток глиобластомы человека T98G. По оси Y приведен процент выживаемости клеток

При нормировании процента выживших клеток относительно количества ауристатинов в образце, можно сделать заключение, что на линии клеток MCF-7 конъюгат HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF обладает большей эффективностью, чем свободный MMAF, а у конъюгата без гомоцистеинового линкера токсичность ниже, чем у пептида, и оба типа конъюгатов оказываются более токсичными в отношении линии T98G, чем свободный пептид MMAF.

Таким образом подтверждается перспективность выбранной стратегии конструирования мультифункциональных конструкций на основе HSA с применением промежуточного гомоцистеинового линкера.

Поскольку БНЗТ в первую очередь ориентировано на лечение таких агрессивных опухолей как глиобластома, изучение цитотоксичности конъюгатов, содержащих борные кластеры, проводилось на клеточных культурах этого вида опухоли.

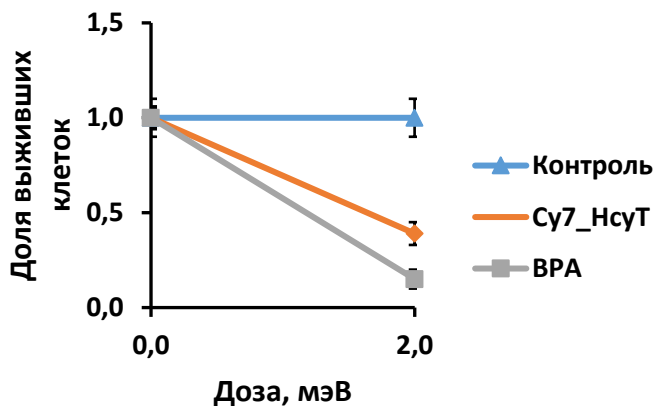


**Рис. 4.** Жизнеспособность клеток T98G при действии HSA, смесью HSA + гемцитабин, содержащий борный кластер, HSA-Cy5-HcyTFAc и HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub> в различных концентрациях.

Выживаемость клеток в присутствии смеси HSA и гемцитабина,

содержащего борный кластер ( $\text{GCB}_{12}\text{H}_{11}$ ), не снижалась в диапазоне использованных концентраций. В присутствии конъюгата  $\text{HSA-Cy5-Hcy-TFAC-GCB}_{12}\text{H}_{11}$  те же концентрации относительно гемцитабина приводили к снижению количества выживших клеток. Полумаксимальная ингибирующая концентрация ( $\text{IC}_{50}$ ) для  $\text{HSA-Cy5-Hcy-TFAC-GCB}_{12}\text{H}_{11}$  составила 0,47 мМ с коэффициентом корреляции  $R = 0,82$ . Это можно объяснить тем, что  $\text{GCB}_{12}\text{H}_{11}$  лучше проникает в раковые клетки в составе конъюгата, чем в составе нековалентного комплекса с альбумином. Таким образом ковалентное связывание аналога гемцитабина с конструкцией альбумина повышает его эффективность.

При обработке конъюгатом  $\text{HSA-Cy5-Hcy-TFAC-GCB}_{12}\text{H}_{11}$  в диапазоне его концентраций до 0,03 мМ без нейтронного облучения клеточная линия сохраняла скорость пролиферации на уровне контроля, более 70% (рис. 4). Таким образом, концентрация конъюгата  $\text{HSA-Cy7-HcyTFAC-GCB}_{12}\text{H}_{11}$  0,02 мМ может быть использована для оценки влияния препарата на образование колоний клеток глиомы в экспериментах по нейтронному облучению, без учета влияния цитотоксичности гемцитабина.



**Рис. 5.** Жизнеспособность клеток глиобластомы человека T98G, прединкубированных с конъюгатом  $\text{HSA-Cy7-HcyTFAC-GCB}_{12}\text{H}_{11}$  или ВРА в условиях БНЗТ.

В качестве положительного контроля был использован  $^{10}\text{B}$ -

борфенилаланин (ВРА) - один из двух препаратов, разрешенных к применению в БНЗТ. Облучение проводилось при одинаковом мольном количестве атомов бора для конъюгата и контроля. Для оценки эффективности БНЗТ использовали клоногенный анализ.

Доля выживаемости клеток глиобластомы человека Т98G при инкубации с конъюгатом и последующем облучении эпитепловыми нейтронами составила  $\approx 0,4$  (рис. 6), что достоверно отличалось от контрольной группы ( $p < 0,0001$ ). Таким образом, конъюгат HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub> при концентрации выше 0,03 мМ демонстрирует синергический эффект между гемцитабином (он обладает токсичностью в отношении раковых клеток без облучения) и *клозо-*додекаборатом (токсичность для раковых клеток усиливается при нейтронном облучении).

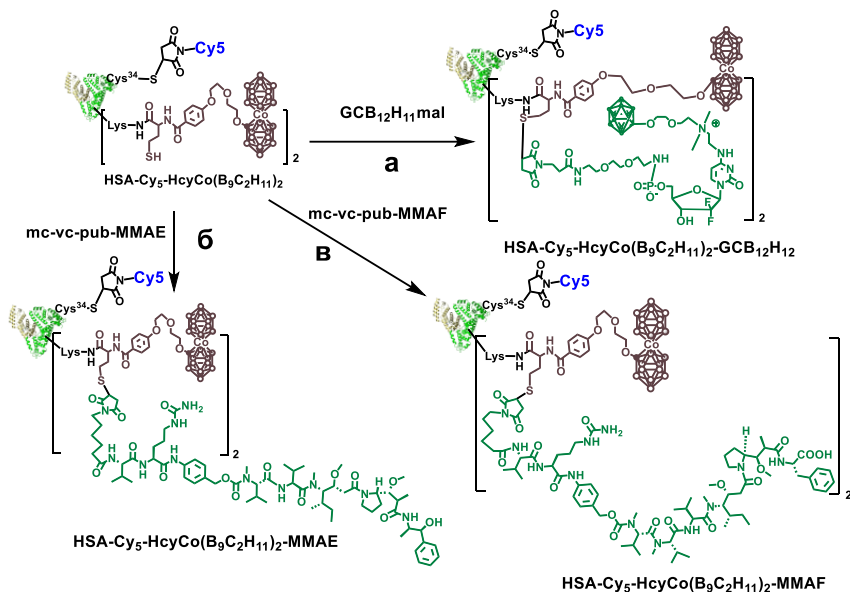
Клоногенный анализ выявил несколько большее снижение жизнеспособности клеток Т98G при использовании <sup>10</sup>B-борфенилаланина по сравнению с конъюгатом HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub> ( $p < 0,01$ ). Однако следует отметить, что борный кластер в конъюгате HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>, содержит природную смесь изотопов бора (20% изотопа <sup>10</sup>B). Можно предположить, что использование конъюгата, содержащего чистый <sup>10</sup>B, приведет к большей терапевтической эффективности. С другой стороны, поскольку выделение чистого изотопа <sup>10</sup>B является достаточно дорогостоящей технологией, использование природного бора может упростить и удешевить получение борсодержащих терапевтических препаратов.

Полученные данные дают надежду на успешную терапию глиобластомы с использованием конъюгата HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub> и требуют дальнейших всесторонних исследований этого соединения.

### **3. Синтез конъюгатов на основе альбумина, содержащих флуоресцентный краситель Cy5, *бис*(дикарболида) кобальта и терапевтическую нагрузку (аналог гемцитабина и ауристатины)**

С целью повышения эффективности БНЗТ без необходимости применения дорогостоящих борных кластеров, содержащий чистый изотоп <sup>10</sup>B, было принято решение заменить трифторацетильную

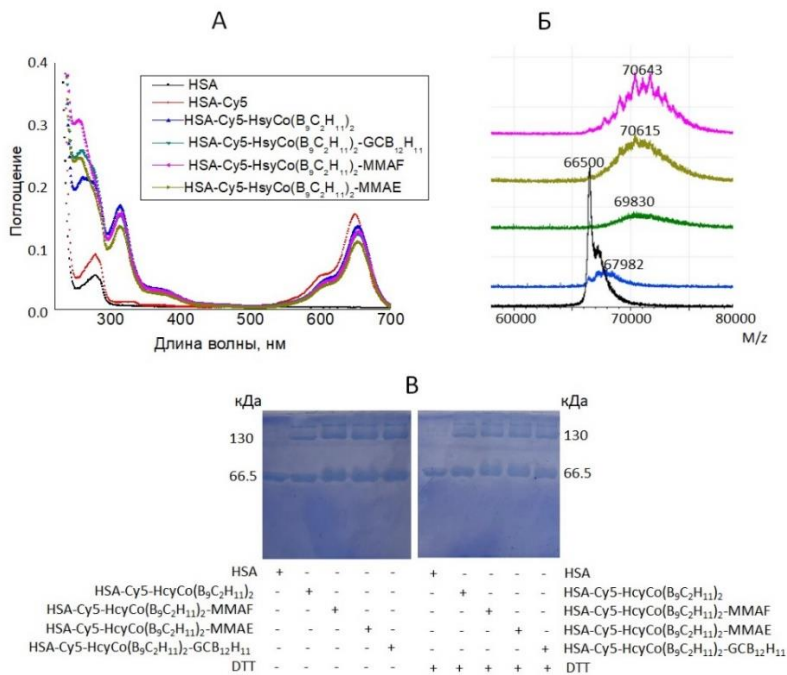
группу в гомоцистеиновом линкере на молекулу, содержащую дополнительный борный кластер - бис(дикарболид) кобальта. На основе флуоресцентно-меченного альбумина, несущего остатки гомоцистеина, ацилированного производным бис(дикарболида) кобальта, нами были сконструированы три терапевтические конструкции: две из них содержали в качестве химиотерапевтической молекулы ауристатины, а третья – аналог гемцитабина, модифицированный клозо-додекаборатом (рис. 6).



**Рис. 6** Общая схема синтеза конъюгатов БНЗТ: HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>; HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAF и HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAE.

Полученный конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub> был модифицирован несколькими химиотерапевтическими молекулами, содержащими производное гемцитабина (рис. 6, а) или ауристатина (MMAE (рис. 6, б) и MMAF (рис. 6, в)). Полученные соединения были охарактеризованы аналогично ранее описанным конъюгатам (рис. 7). По данным масс-спектрометрии MALDI ToF, молекулярная

масса конъюгата HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub> отличается от молекулярной массы HSA-Cy5 на 716 Да. Это соответствует добавлению двух молекул HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub> на молекулу белка (рис. 7, панель Б).



**Рис. 7.** Характеристики многофункциональных конъюгатов сывороточного альбумина человека. (А): Электронные спектры поглощения HSA и его гомоцистамидов в буфере PBS, pH 7,4; (Б): MALDI-ToF-спектры; (В): SDS-PAGE гомоцистамидных конъюгатов HSA в условиях Леммли с последующим окрашиванием кумасси синим.

Степень модификации HSA-Cy5 производным тиолактона гомоцистеина HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub> подтверждается данными метода атомно-эмиссионной спектроскопии.

Модификация HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub> малеимидными аналогами химиотерапевтических остатков приводит к незначительному снижению подвижности модифицированных конъюгатов альбумина при электрофорезе в белковом геле, что можно объяснить увеличением массы конъюгатов (рис. 7, панель Б).

Данные масс-спектрометрии MALDI-ToF указывают на увеличение массы конъюгата HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub> на 1848, 2633 и 2661 Да в случае синтеза из него конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>, HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAE и HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAF, соответственно. Это соответствует добавлению 2 остатков каждого малеимидного реагента на молекулу белка (рис. 7, панель Б).

Все полученные на данном этапе конъюгаты, содержащие терапевтические молекулы, показали более высокую цитотоксичность в отношении клеток глиомы человека T98G в диапазоне концентраций 2 – 30 мкМ нежели конъюгат HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>.

В таблице 2. Приведены значения полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC<sub>50</sub>) для борсодержащих конъюгатов HSA Коэффициентом корреляции не менее R = 0,88.

Таблица 2. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC<sub>50</sub>) для борсодержащих конъюгатов HSA.

| Линия клеток | Образец                                                                                                       | IC <sub>50</sub> (мкМ) |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| T98G         | HSA-Cy5-HcyCo(B <sub>9</sub> C <sub>2</sub> H <sub>11</sub> ) <sub>2</sub> -MMAE                              | 0.034                  |
|              | HSA-Cy5-HcyCo(B <sub>9</sub> C <sub>2</sub> H <sub>11</sub> ) <sub>2</sub> -MMAF                              | 0,147                  |
|              | HSA-Cy5-HcyCo(B <sub>9</sub> C <sub>2</sub> H <sub>11</sub> ) <sub>2</sub> -GCB <sub>12</sub> H <sub>11</sub> | 0,132                  |

Данные конструкции при более высокой цитотоксичности содержат большее количество атомов бора, чем описанная выше конструкция HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>. На основании этих результатов можно ожидать, что конструкции HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>, HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAF и HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAE будут при облучении эпитемальными нейтронами обладать большими значениями цитотоксичности в отношении клеток глиомы уже при меньших дозах, чем в случае HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>.

## ВЫВОДЫ

1) Разработан подход к получению на основе альбумина бимодальных мультифункциональных наноконструкций для комбинированной тераностики злокачественных опухолей. Подход основан на реакциях «тиол-клик» химии и посттрансляционной модификации белка – *N*-гомоцистеинилировании с использованием аналогов природного модификатора – производных тиолактона гомоцистеина.

2) Обнаружено, что противоопухолевая активность конъюгатов HSA с противоопухолевым пептидом MMAF, полученных с использованием промежуточного гомоцистеинового линкера, значительно превосходит противоопухолевую активность конъюгатов, полученных методом прямого присоединения MMAF по аминокетогруппам остатков лизина в HSA.

3) Разработан подход к получению борсодержащих мультифункциональных наноконструкций, снабженных структурными элементами, которые обеспечивают молекулярную мультимодальную визуализацию злокачественных областей и активацию различных механизмов гибели в них опухолевых клеток. В основе подхода лежит постсинтетическая селективная модификация остатка Cys-34 и остатков лизина сывороточного альбумина, приводящая к объединению в единую мультифункциональную борсодержащую терапевтическую конструкцию следующих элементов:

(а) белка-транспортера;

(б) терапевтического блока (мометилауристатина, конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAE и конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAF) и ингибитор нуклеинового обмена гемцитабин, функционализированный по экзоциклической аминокетогруппе *клиззо*-додекабором, (конъюгат HSA-Cy7-HcyTFAC-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub>);

(в) расщепляемого линкера; (в случае конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAE и HSA-Cy5-HcyCo(B<sub>9</sub>C<sub>2</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-MMAF благодаря инициированию реакции с катепсином, уровень которого повышен в раковых клетках, или в случае конъюгата HSA-Cy7-HcyTFAC-GCB<sub>12</sub>H<sub>11</sub> за счет pH лабильной связи);

(г) визуализирующего блока (флуорофор  $\text{Cu5/Cu7}$  для оптической томографии/контрастный агент для  $^{19}\text{F}$  МРТ).

4) Осуществлена оценка противоопухолевой активности борсодержащих мультифункциональных наноконструкций *in vitro* с использованием МТТ-теста.

Обнаружен, что конъюгат  $\text{HSA-Cu5-HcyCo(B}_9\text{C}_2\text{H}_{11})_2\text{-MMAE}$  обладает большей противоопухолевой активностью по сравнению с конъюгатом  $\text{HSA-Cu5-HcyCo(B}_9\text{C}_2\text{H}_{11})_2\text{-MMAF}$ .  $\text{IC}_{50}$  разработанных конъюгатов составила не менее 0,034 мкМ по отношению к клеткам глиомы Т98G с коэффициентом корреляции не менее  $R = 0,88$ .

При обработке клеток линии Т98G конъюгатом  $\text{HSA-Cu5-HcyTFAC-GCB}_{12}\text{H}_{11}$ , выживаемость клеток уменьшается в зависимости от дозы, и самое низкое значение выживаемости достигается при концентрации 60 мкМ (60,2% выживаемость). В то же время, гемцитабин в тех же концентрациях проявляет более низкую цитотоксическую активность.

5) Клоногенный анализа показал, что пролиферация клеток глиобластомы человека Т98G, предварительно обработанных конъюгатом  $\text{HSA-Cu5-Hcy-TFAC-GCB}_{12}\text{H}_{11}$  в концентрации при которой конъюгат не проявляет цитотоксичности, снижается после проведения БНЗТ. Данные сопоставимы с таковыми при инкубации клеток с  $^{10}\text{B}$ -борфенилаланином.

### Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. **Meiling Wang**, Ivan A. Moskalev, Olga D. Zakharova, Anna I. Kasatova, Vladimir N. Silnikov, Tatyana V. Popova, Tatyana S. Godovikova. Development of theranostics albumin auristatin conjugates for combining chemotherapy with boron neutron capture therapy// Journal of Biology and Today's World 2024. V.13(1). P.001-007. DOI:10.35248/2322-3308-13.1.001.

2. Raskolupova V.I., **Wang M.**, Dymova M.A., Petrov G.O., Shchudlo I., Taskaev S.Y., Abramova T.V., Godovikova T.S., Silnikov V.N., Popova T.V. Design of the New Closo-Dodecarborate-Containing Gemcitabine Analogue for the Albumin-Based Theranostics Composition// Molecules 2023. V.28. P. 2672. DOI:10.3390/molecules28062672

3. **Ван М.**, Рогалева В. И., Попова Т. В., Захарова О. Д., Годовикова

Т. С., Сильников В. Н. Изучение *in vitro* влияния гомоцистеинового линкера на поведение конъюгатов сывороточного альбумина человека и монометилауристатина F // Химия в интересах устойчивого развития. 2024. Т. 32, № 6. С. 773–782. DOI:10.15372/KhUR2024610