

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

ВАН МЭЙЛИН

**РАЗРАБОТКА БОРСОДЕРЖАЩИХ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАНОКОНСТРУКЦИЙ НА
ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ АЛЬБУМИНА ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ.**

1.4.9 - Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н. Сильников В.Н.

НОВОСИБИРСК – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ	4
-------------------	----------

ВЕДЕНИЕ	6
----------------	----------

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
-----------------------------------	----------

1.1. ВЕДЕНИЕ	9
---------------------	----------

1.2. ИНГИБИТОР МИКРОТРУБОЧЕК АУРИСТИН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ.	10
---	-----------

1.2.1. ЛИНКЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ СОЕДИНЕНИЯ АУРИСТАТИНОВ С БЕЛКОВЫМИ НОСИТЕЛЯМИ.	12
--	----

1.2.2. РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ ЛИНКЕРЫ.	25
------------------------------	----

1.2.2.1 Кислотолабильные (рН-чувствительные) линкеры	25
--	----

1.2.2.2. Дисульфидные линкеры	28
-------------------------------	----

1.2.2.3. Пероксид-лабильные линкеры.	29
--------------------------------------	----

1.2.2.4. Ферментативно расщепляемые линкеры.	30
--	----

1.2.2.5. Линкеры, расщепляемые β -глюкуронидазой.	38
---	----

1.2.2.6. Линкер, расщепляемый N-ацетил- β -d-глюкозаминидазой.	41
--	----

1.2.2.7. Биоразлагаемый гидрофильный полимерный линкер.	42
---	----

1.2.2.8. Радиационно-чувствительный линкер.	44
---	----

1.2.3. НЕРАСЩЕПЛЯЕМЫЕ ЛИНКЕРЫ	46
-------------------------------	----

1.3. ВВЕДЕНИЕ В МЕТОД БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ.	56
---	-----------

1.3.1. ПРОБЛЕМА ДОСТАВКИ БОРА В ОПУХОЛЕВУЮ ТКАНЬ.	57
---	----

1.3.2. БОРИРОВАННЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА	58
---	----

1.3.3. БНЗТ-ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АЛЬБУМИНА	60
---	----

1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	65
------------------------	-----------

РАЗДЕЛ 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	66
--	-----------

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	66
--------------------------------	-----------

2.1.1. РЕАКТИВЫ	66
-----------------	----

2.1.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	67
---------------------------------	----

2.1.3. СИНТЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ	69
2.1.3.1. Синтез флуоресцентно меченного альбумина	69
2.1.3.2. Синтез HSA-Cy5-MMAF	69
2.1.3.3. Синтез конъюгатов альбумина с трифторацелированным гомоцистеином и полезной нагрузкой (ауристатин ММАF и ММАЕ, гемцитабин, модифицированный <i>клозо</i> -додекабораном)	70
2.1.3.4. Синтез конъюгатов альбумина с бис-карболидным аналогом гомоцистеина и полезной нагрузкой (ауристатин ММАF и ММАЕ, гемцитабин, модифицированный <i>клозо</i> -додекабораном)	75
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	77
3.1. СОЗДАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННОГО АЛЬБУМИНА	77
3.2. СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ АЛЬБУМИНА, СОДЕРЖАЩИХ Cy5 и MMAF	79
3.3. КОНЪЮГАТЫ АЛЬБУМИНА, СОДЕРЖАЩИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КРАСИТЕЛИ Cy5/Cy7, ТРИФТОРАЦЕТИЛГОМОЦИСТЕИН (HTLTFAC), АУРИСТАТИН MMAF/MMAE	81
3.3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ КОНЪЮГАТОВ HSA-Cy5-HcyTFAC-MMAF (СПОСОБ СИНТЕЗА 2), HSA-Cy5-MMAF, HSA-Cy5-HcyTFAC-MMAE, НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ.	88
3.4. СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ HSA-Cy5-HcyTFAC-GCB₁₂H₁₁ и HSA-Cy7-HcyTFAC-GCB₁₂H₁₁.	92
3.4.2. АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОНЪЮГАТОВ HSA-Cy5-HcyTFAC-GCB ₁₂ H ₁₁ и HSA-Cy7-HcyTFAC-GCB ₁₂ H ₁₁ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА T98G.	95
3.5. СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ НА ОСНОВЕ АЛЬБУМИНА, СОДЕРЖАЩИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ КРАСИТЕЛЬ Cy5, БИС(ДИКАРБОЛИДА) КОБАЛЬТА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКУЮ НАГРУЗКУ (АНАЛОГ ГЕМЦИТАБИНА И АУРИСТАТИНЫ)	97
3.5.1 ХАРАКТЕРИСТИКИ КОНЪЮГАТОВ HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -GCB ₁₂ H ₁₁ , HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -MMAF, HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -MMAE	99
3.5.2 АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОНЪЮГАТОВ HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -GCB ₁₂ H ₁₁ , HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -MMAF, HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -MMAE В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА (ЛИНИИ КЛЕТОК T98G и U87).	101
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106

СОКРАЩЕНИЯ

- АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой;
- БНЗТ – бор-нейтронозахватная терапия;
- ДМСО – диметилсульфоксид;
- ДТТ – дитиотреит;
- ИК-спектрометрия – инфракрасная спектрометрия;
- ПААГ – полиакриламидный гель;
- ТСХ – тонкослойная хроматография;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
- ADC - antibody-drug conjugate;
- $B_{12}H_{11}$ – *клозо*-додекаборан;
- ВРА – борфенилаланин;
- BSA – бычий сывороточный альбумин;
- BSH – боркапнат натрия;
- $Co(B_9C_2H_{11})_2$ – *бис*(дикарболид) кобальта;
- DIPEA – диизопропилэтиламин;
- EPR-эффект – эффект повышенной проницаемости и задерживания;
- FDA - Food and Drug Administration;
- Hcy – гомоцистеин;
- HSA – человеческий сывороточный альбумин;
- HTL – тиолактон гомоцистеина;
- HTLTFAs- трифторацетилированный тиолактон гомоцистеина;
- HTL- $B_{12}H_{11}$ – производное тиолактона гомоцистеина, несущее *клозо*-додекаборат;
- HTL- $Co(B_9C_2H_{11})_2$ – производное тиолактона гомоцистеина, несущее *бис*(дикарболид) кобальта;
- MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия;

mal-GCB₁₂H₁₁ – малеимидное производное гемцитабина, связанное с *клозо*-додекаборатом;

MID – малеимидное производное *клозо*-додекабората;

MMAE – монометилауристатин E;

MMAF – монометилауристатин F;

mc-vc-pab – малеимидокапроил-Валин-Цитруллин-*n*-аминобензил

PBS – фосфатный буферный физиологический раствор;

SDS – додецилсульфат натрия;

T/B – соотношение концентраций бора в опухоли и в крови

T/N – соотношение концентраций бора в опухоли и в здоровых тканях

ESI – электроспрей-масс-спектрометрия;

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, тиолактон гомоцистеина, MMAE, MMAF, *клозо*-додекаборат, бис(дикарболид) кобальта, гемцитабин, бор-нейтронозахватная терапия, тераностика.

ВЕДЕНИЕ

Создание эффективных методов лечения раковых опухолей до сих пор является актуальной задачей. При этом грамотное нацеливание терапевтического средства на опухоль – мишень решает сразу несколько проблем. Первое – при хорошей специфичности терапевтической конструкции по отношению к опухоли уменьшается токсическое воздействие на здоровые ткани, что снижает возможность проявления побочных эффектов при лечении. Второе – появляется возможность накопить большое количество терапевтического агента в опухоли. Это может способствовать снижению дозировок лекарства, что уменьшит системную токсичность препарата. Особенно важен второй момент при проведении лучевой терапии (например, бор-нейтронозахватной терапии /БНЗТ), так как в случае использования этого метода эффективность уничтожения опухоли напрямую зависит от количества чувствительного к облучению вещества, накопившегося в раковой клетке.

Белки, в норме присутствующие в организме, такие, как альбумин или антитела, являются хорошей платформой для создания терапевтических конструкций, имеющих повышенную специфичность в отношении раковых клеток. Высокая специфичность воздействия конструкций на основе таких белков на раковые клетки частично связана со сверхэкспрессией рецепторов к белкам на поверхности опухолевых клеток, частично вызвана EPR-эффектом (Enhanced Permeability and Retention Effect). Однако эффективность такой конструкции будет сильно зависеть от таких параметров химической модификации белковой структуры, как степень модификации белка – носителя терапевтической молекулой, неизменность конформационной структуры белка, важной для выполнения им биологических функций.

Человеческий сывороточный альбумин является наиболее распространенным переносчиком разнообразных веществ в плазме крови и обладает хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью и низкой иммуногенностью, устойчивостью при хранении в сухом виде и в растворах. Он широко применяется для создания конструкций, транспортирующих противораковые лекарства. Причем некоторые из них были одобрены FDA и в настоящее время используются в клинических методах лечения. Однако химия направленного введения нагрузки на данный момент весьма ограничена: наиболее очевидными модифицируемыми остатками белка являются одиночные остатки цистеина-34 (Cys-34). Однако, лишь около 30% остатков Cys-34 в составе альбумина существует в свободной форме, доступной для модификации. Восстановление альбумина с целью

добавления свободных меркапто-групп, зачастую, нарушает его структуру и может негативным образом сказаться на его биологических функциях. В нашей работе мы используем стадию ацилирования альбумина аналогами тиолактона гомоцистеина по доступным остаткам лизина. Эта стратегия позволяет не только увеличить количество необходимых меркаптогрупп, но и ввести в состав альбумина дополнительные полезные (терапевтические, или сигнальные) молекулы, заранее присоединенные по аминокруппе тиолактона.

Таким образом, наша работа посвящена конструированию на платформе человеческого сывороточного альбумина (HSA) тераностиков, содержащих химиотерапевтические агенты (ауристатины, гемцитабин), атомы бора (в составе кластеров *клозо*-додекаборана, или *бис*(дикарболида) кобальта) и сигнальные метки (флуоресцентные остатки и атомы фтора). Остаток Cys-34 в составе HSA был задействован нами для введения флуоресцентной метки. Посредством гомоцистеинового фрагмента в состав конструкций были введены остатки содержащие атомы фтора или борные кластеры, меркапто-группы гомоцистеиновых фрагментов были задействованы под присоединение химиотерапевтических молекул. Успешное получение тераностиков подтверждено различными физико-химическими методами. Полученные новые конструкции могут быть использованы в области химиотерапии или комбинации химиотерапии и БНЗТ. На данном этапе работы изучена их цитотоксичность *in vitro*.

Актуальность работы.

Полученные тераностические конструкции совмещают как возможность одновременной терапии и диагностики раковых опухолей, так и возможность совмещения химиотерапии и БНЗТ. Последнее может быть хорошим фактором для преодоления устойчивости раковых опухолей к терапии.

Стратегия создания тераностиков на основе человеческого сывороточного альбумина служит ступенью к персонализированной медицине, когда используется альбумин конкретного пациента.

Часть полученных конструкций обладает повышенным содержанием атомов бора, что является актуальным для лечения глиом методом БНЗТ.

Целью нашей работы является 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}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.

В соответствии с целью были поставлены задачи:

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.

Личный вклад автора. 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.

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. Расколуповой 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.

РАЗДЕЛ 1. Обзор Литературы

1.1. Ведение

Создание эффективных методов лечения раковых опухолей до сих пор является актуальной задачей. При этом грамотное нацеливание терапевтического средства на опухоль – мишень решает сразу несколько проблем. Первое – при хорошей специфичности терапевтической конструкции по отношению к опухоли уменьшается токсическое воздействие на здоровые ткани, что снижает возможность проявления побочных эффектов при лечении. Второе – появляется возможность накопить большое количество терапевтического агента в опухоли. Это может способствовать снижению дозировок лекарства, что, опять – таки, уменьшит системную токсичность препарата. Особенно важен второй момент при проведении лучевой терапии (например, бор-нейтронозахватной терапии), так как в этом случае эффективность уничтожения опухоли зависит от количества чувствительного к облучению вещества, накопившегося в раковой клетке.

Белки, в норме присутствующие в организме, такие, как антитела и альбумин, являются хорошей платформой для создания терапевтических конструкций, имеющих повышенную специфичность в отношении раковых клеток. Частично это вызвано сверхэкспрессией рецепторов на поверхности раковых клеток, частично опосредовано EPR-эффектом (Enhanced Permeability and Retention Effect). Однако эффективность такой конструкции будет сильно зависеть от таких параметров химической модификации белковой структуры, как гомогенность модифицированного белка и количество полезной нагрузки (степень модификации белка – носителя терапевтической молекулой).

Биоорганическая химия, на данное время, позволяет использование огромного количества способов модификации белка как *in vitro*, так и *in situ*. В этом литературном обзоре мы хотим рассмотреть научные работы в ключе используемых способов присоединения к белковым носителям таких терапевтических агентов, как ауристатины (используются в химиотерапии раковых опухолей) и атомы бора (используются в бор-нейтронозахватной терапии раковых опухолей). Выбор полезных нагрузок (ауристатины и бор) обусловлен большим интересом, проявляемым научным сообществом к этим терапевтическим агентам и возможностью совмещения этих двух видов терапии.

1.2. Ингибитор микротрубочек ауристин и его производные.

Микротрубочки, составляющие цитоскелет клетки, представляют собой высокодинамичные белковые полимеры, состоящие из повторяющихся гетеродимеров α - и β -тубулина. Они участвуют во множестве клеточных процессов у эукариот, включая деление клеток, дифференцировку, транспорт и подвижность [1][2][3].

Динамическая нестабильность микротрубочек возникает в результате регулируемых событий ассоциации и диссоциации отдельных димеров тубулина с концов микротрубочек и связана с процессом гидролиза GTP, взаимодействующего с β -тубулином (рис. 1) [1][2][3]. При гидролизе GTP начинает преобладать процесс разборки микротрубочек с высвобождением GDP-димера тубулина. Замена GDP на GTP в составе димера усиливает процесс полимеризации и надстройки микротрубочек [4] [5].

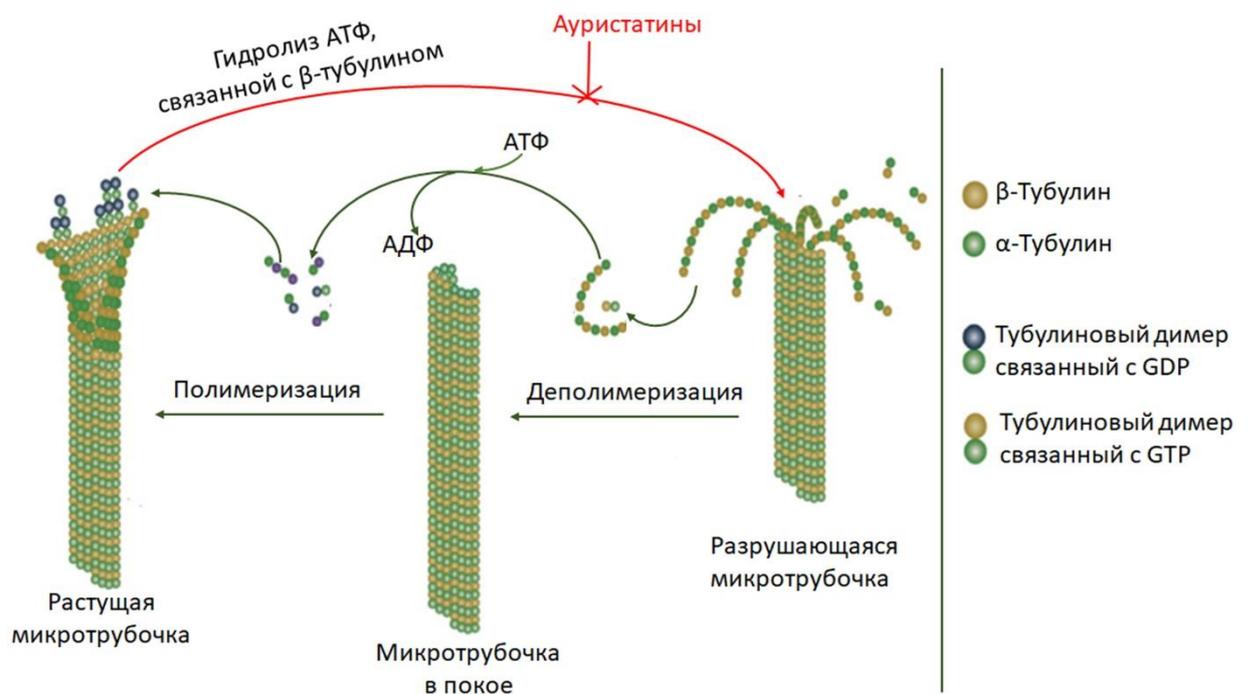


Рис. 1. Влияние ауристатинов на изменение GTP и GDP, влияющих на образование микротрубочек [5].

Поскольку цитоскелет важен для правильного функционирования всех органелл клетки, недостаточный, или избыточный рост микротрубочек может привести к ее гибели [6]. В связи с этим, вещества, влияющие на динамику роста – распада микротрубочек являются перспективными агентами для терапии опухолей в том случае, если им будет придана селективность в отношении раковых клеток.

Ингибиторы тубулина, являющиеся объектами различных исследований, можно разделить на 4 вида: ауристатины, майтансиноиды, тубулизины, криптофицины. Самый большой класс цитотоксических агентов, входящих в состав различных терапевтических конъюгатов и проходящих клиническую разработку, — это соединения на основе ауристатинов. Ауристатины являются синтетическими аналогами природного антимитотического агента доластатина 10 (рис. 2) [7].

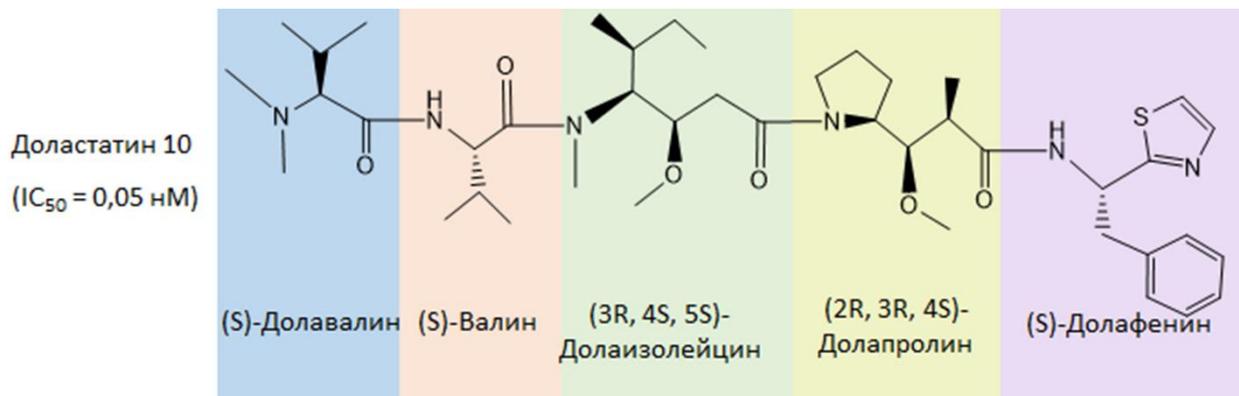


Рис. 2. Структура доластатина 10 и его основных аминокислотных строительных блоков. GI₅₀ - концентрация, обеспечивающая 50% ингибирования клеточной пролиферации [8].

Ауристатины (рис. 3) предотвращают гидролиз молекул GTP на β -субъединице тубулина, вызывая непрерывный и избыточный рост микротрубочек (рис. 1) [4][5].

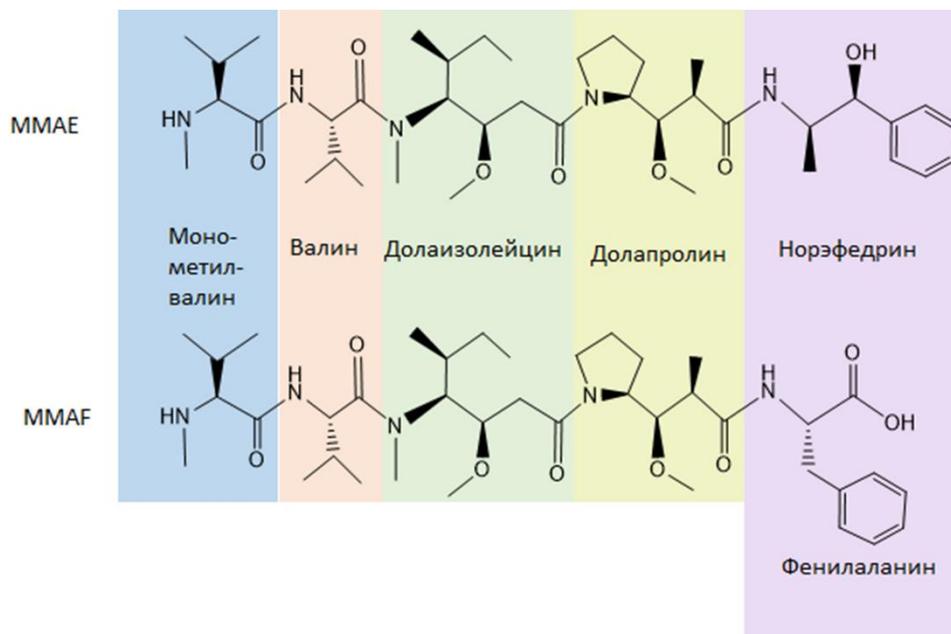


Рис. 3. Химическая структура MMAE и MMAF [4].

Сходство монометилауристатинов E и F (MMAE и MMAF, соответственно) с доластатином 10 ограничивается тремя остатками аминокислот из четырех, имеющихся в

составе (Рис. 3) [7][9][10][11][12][13]. Долавалин, находящийся на *N*-конце доластатина заменен у ММАЕ и ММАФ на метилвалин, вторичная аминогруппа которого обеспечивает присоединение линкера и последующую конъюгацию с носителем [8]. Амин долафенин, находящийся на *C*-конце доластатина 10 заменен на норэфедрин в случае ММАЕ и на фенилаланин в случае ММАФ. Дополнительный отрицательный заряд находящийся на *C*-конце ММАФ обеспечивает ему меньшую способность, по сравнению с ММАЕ [12], проникать через мембрану самостоятельно, что сказывается на увеличении токсичности данного ауристатина в отношении любых клеток, как раковых, так и здоровых.

Таким образом, ауристатины обладают исключительной цитотоксичностью, которая примерно в 100–1000 раз выше, чем у доксорубина, ранее часто используемого противоракового препарата [14]. Это означает, что их точное нацеливание на мишень позволяет создать очень мощное оружие против опухоли. Первая часть данного обзора посвящена стратегиям соединения ауристатинов с белковыми молекулами, обеспечивающими селективность их воздействия.

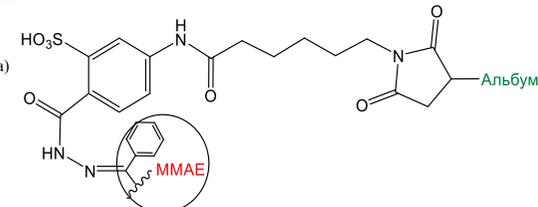
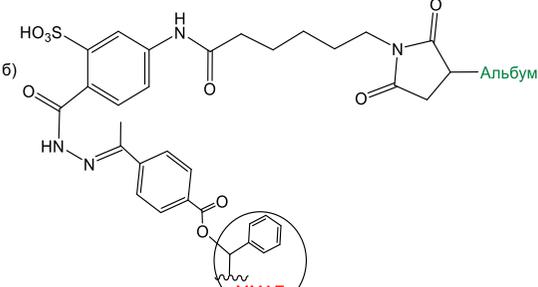
1.2.1. Линкеры, используемые для соединения ауристатинов с белковыми носителями.

Линкер, связывающий носитель с цитотоксическим лекарственным средством, играет важную роль в проявлении токсичности, фармакокинетических свойств и терапевтического индекса (отношение максимальной дозы лекарственного средства, не проявляющей токсичности, к дозе, дающей нужный эффект). Идеальный линкер должен быть стабильным в кровотоке, предотвращая преждевременное высвобождение лекарственного средства из терапевтической конструкции. При интернализации опухоли линкер не должен мешать эффективному высвобождению лекарственного средства внутри клетки.

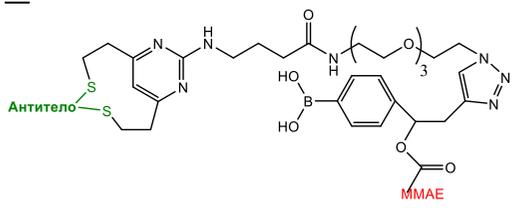
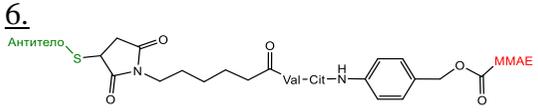
В зависимости от механизма высвобождения лекарственного средства линкеры можно разделить на две категории, а именно расщепляемые и нерасщепляемые линкеры. В свою очередь, расщепляемые линкеры могут быть химически расщепляемыми (кислотолабильные и дисульфидные линкеры) и ферментативно расщепляемые (например, линкеры пептидной природы, олигосахаридны линкеры и прочие).

В таблице 1 и 2 приведены примеры линкеров, применяемые для присоединения ауристатинов к молекулам носителям. Сами конструкции будут подробно рассмотрены в последующих главах.

Таблица 1. Противоопухолевые конъюгаты ауристатинов с молекулами белка, созданные с использованием лабильных линкеров

Категория линкера	Название	Структура	Механизм расщепления	Объект модификации ауристатином	Соотношение препарат/белок	Назначение	Статус исследования	Лит.ист.
Химически лабильные линкеры								
A) Кислот олабиль ные линкеры	а) АЕ- Keto- Sulf07 б) АЕ- Ester- Sulf07	<p><u>1.</u></p> <p>а) </p> <p>б) </p>	Расщепление гидразоновых связей в кислых условиях.	HSA, <i>in situ</i>	1	Меланома А375, карцинома яичника А2780, немелкоклеточный рак легкого LXFA737 и LXFE937, плоскоклеточный рак головы и шеи.	<i>In vitro</i> <i>in vivo</i> (мыши).	[15]

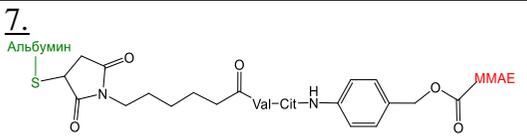
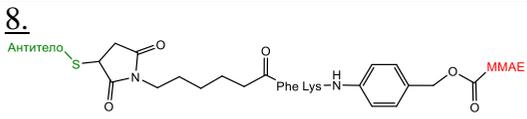
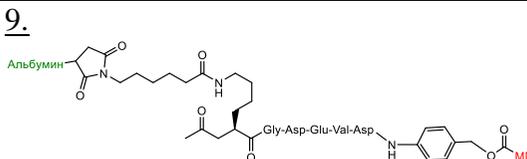
	MBM-BCN-MMAE	<p>2.</p>	Расщепление карбонильной связи в кислых условиях.	Рекомбинантный человеческий альбумин (rHA).	1	Рак поджелудочной железы MIA PaCa-2.	<i>In vitro.</i>	[16]
Б) Дисульфидные линкеры	STxB-MMAE/ STxB-MMAF	<p>3.</p>	Восстановление дисульфидных связей.	В-субъединица шигатоксина (STxB), нацеленная на Gb3.	5	Колоректальная карцинома (HT29).	<i>In vitro.</i>	[17]
	THIOMA B-PDS-MMAE	<p>4.</p>		THIOMAB антитела, содержащие одноаминокислотные замены на цистеин (анти-CD22, CD33,	>0.5	--	Анализ стабильности в плазме мышей.	[18]

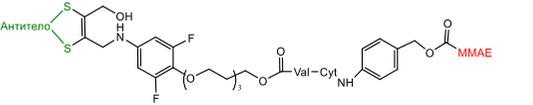
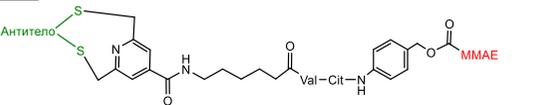
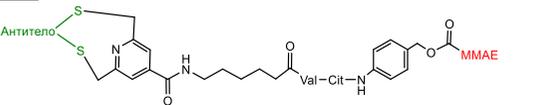
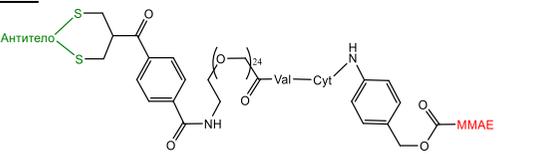
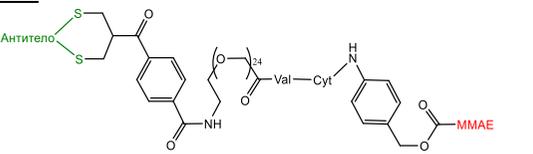
				CLL-1 и Lybe).				
В) Пероксид-лабильные линкеры	ADC-1 ADC-4	<u>5.</u> 	Внеклет. расщепление арилборатных эфиров и деградация в лизосомах.	Трастузумаб (IgG1 против Her2), дурвалумаб (против PD-L1).	3,7 (с трастузумабом) 3,6 (с дурвалумабом).	Рак молочной железы (SKBR3 и BT474, MCF7, MDA-MB-231).	<i>In vitro.</i>	[19]
Ферментативно расщепляемые линкеры								
А) Пептидные расщепляемые линкеры	cAC10-vcMMAE	<u>6.</u> 	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосомах.	Антитела cAC10 против CD30.	8	Лимфома Ходжкина L540, KM-H2, HDLM-2, L428, ALCL, Karpas 299, L540cy.	<i>In vivo.</i>	[20]
	Adcetris			Антитела против CD30.	4	анапластическая лимфома и лимфома Ходжкина.	одобрен FDA в 2011 году.	[21]

	Padsev			Антитела против Nectin 4.	4	Уротелиальный рак.	одобрен FDA в конце декабря 2019 года.	[21]
	Polivy			Антитела против CD79b.	4	диффузная крупноклеточная В-клеточной лимфома.	одобренного FDA в июне. 2019 г. в сочетании с химиотерапией на основе бендамустина и ритуксимабома.	[21]
	Thiomab (TDC antiMUC1 б)			Антитела против MUC16.	2	Рак яичников.	Фаза I.	[21][22]
	LR 004-VC-MMAE/			Антитело LR004 против EGFR.	4	Плоскоклеточный рак пищевода (KYSE150, KYSE520), эпидермоидная карцинома (A431), немелкоклеточный рак легкого (A549, NCI-H1975,	<i>In vitro, in vivo</i> (мышь).	[24]

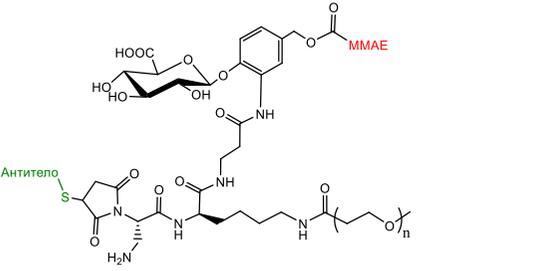
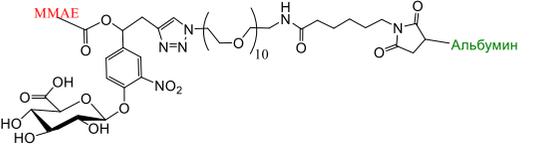
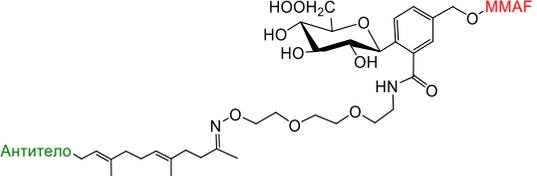
						НСС827), анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL; Каграс 299), рак молочной железы (MDA-MB-468, MCF-7), рак поджелудочной железы (AsPC-1).		
	cAC10-VC-MMAE			Антитело cAC10 против CD30.	2/4/6/8	Лимфома.	<i>In vitro u in vivo</i> (мышь).	[25]
	mAb-Val-Cit-MMAE			Антитела cBR96 (против Lewis Y на карциномах) и cAC10 (против CD30).	~8	Карцинома молочной железы H339631, колоректальная карцинома RCA10, аденокарциномалегких L298710, анапластическая крупноклеточная лимфома Каграс 299.	<i>In vitro u in vivo</i> (мышь).	[9]
	THIOMA B-vc-PAV-MMAE			THIOMAB антитела, содержащие одноаминокислотные	>0.5	-	Анализ стабильности в плазме мышей.	[18]

				замены на цистеин (анти-CD22, CD33, CLL-1 и Лубе).				
	SIP(F16)-MMAE, IgG(F16)-MMAE		Расщепление сериновыми протеазами во внеклеточном пространстве опухоли.	антитела F16 против сплайс-изоформы тенаксина-С (полномерные и частичные).	2	Глиобlastома U87, эпидермоидная карцинома A431, MDA-MB-231.	<i>In vivo.</i>	[26]
	MLN0264			MLN2045 гуанилилциклаза C(GCC).	4.2	метастатический колоректальный рак/рак желудка и поджелудочной железы.	<i>In vitro.</i>	[27]
	anti-B7H4(h1D11)-MC-vc-PAB-MMAE/(h1D11TDC)			ТН10МАВ антитела против B7-H4.	2	Рак молочной железы МХ-1 HCC1569-Х2.	<i>In vivo.</i>	[28]
	cAC10-VC-MMAE			Антитело cAC10 против CD30	2/4	Лимфома Karpas-299 L540cy.	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> (мыши).	[29]

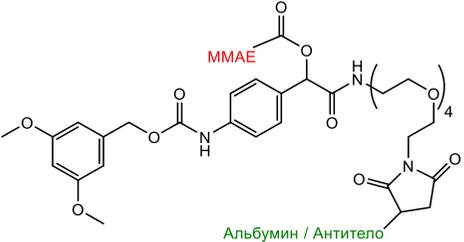
				заменой Cys на Ser.					
	cAC10- VC- MMAE				Антитело сAC10 против CD30.	0/2/ 4/8	Лимфома.	<i>In vivo</i> (мыши и яванские обезьяны).	[30]
	ALDC1 ALDC3	7. 	Расщепление амидной связи цитруллин- РАВС катепсином В в лизосомах.	Рекомбина нтные HSA и MSA.	1/3	рак поджелудочной железы человека MIA PaCa2.	<i>In vivo</i> (мыши).	[31]	
	cAC10/cB R96-phe- lys- MMAE	8. 	Расщепление амидной связи цитруллин- РАВС катепсином В в лизосомах.	Антитела сBR96 (против Lewis Y) и сAC10 (против CD30).	~8	Карцинома молочной железы H339631, колоректальная карцинома RCA10, аденокарциномалег ких L298710, анапластическая крупноклеточная лимфома Karpas 299.	<i>in vitro u in vivo</i> (мыши).	[9]	
	Alb- MPD02	9. 	Расщепление амидной связи Asp-РАВС каспазой-3 в клетках.	HSA (связывани е с белком <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>).	1	Рак легких MDA- MB-231, MCF7 и HCC70.	<i>In vitro u in vivo</i> (мыши).	[32]	

ADC 9MW2821	<p><u>10.</u></p> 	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосомах.	Антитело MW282 против Nectin-4.	4	Доклиника: NCI-N322, HT1376, BT474, MDA-MB-231, T24, PC-3, SW780 MDA-MB-468У Клиника: распространенные солидные опухоли.	Доклиника: <i>in vitro u in vivo</i> (мыши, яванские обезьяны) Клиника: фазы I/II (NCT05216965 и NCT05773937).	[33]
MF-BTX-MMAE	<p><u>11.</u></p> 	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосомах.	Брентукси маб сAC10 против CD30.	4	Т-клеточная лимфома Karpas 299.	<i>In vitro u in vivo</i> (мыши).	[34]
MF-TTZ-MMAE	<p><u>11.</u></p> 	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосомах.	Трастузума б (IgG1 против Her2).	4	Рак молочной железы CDX MCF7.	<i>in vitro u in vivo</i> (мыши).	[35]
а) TRA-bisAlk-vc-MMAE б) FabTRA-bisAlk-vc-MMAE	<p><u>12.</u></p> 	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосомах.	Трастузума б (IgG1 против Her2) полный и частичный.	а) 2,8 и 2 - 4 б) 1	Рак молочной железы SK-BR-3, BT-474, A549 и MCF-7.	<i>In vitro u in vivo</i> (мыши).	[36]
TRA-bisAlk-vc-MMAE	<p><u>12.</u></p> 	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосомах.	Трастузума б (IgG1 против Her2).	1 и 4	Рак молочной железы SK-BR-3, BT-474, JIMT-1.	<i>In vitro u in vivo</i> (мыши).	[37]

ADC 401-4	<p><u>13.</u></p>	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосома.	mAb 401 против В7-Н3	4	Глиобластома U87.	<i>In vitro u in vivo</i> (мышь).	[38]
TRA-N3-PEG3-PAV-MMAE	<p><u>14.</u></p>	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосома.	Трастузума б (IgG1 против Her2).	4	Рак молочной железы MDA-MB-231, SK-BR-3.	<i>In vitro.</i>	[39]
Magacizu mab-PD-MMAE	<p><u>15.</u></p>	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосома.	Магацизума аб (Ig4 против LRG1).	4	Меланома мыши В16F0.	<i>In vitro u in vivo</i> (мышь).	[40]
CTX-MMAE	<p><u>16.</u></p>	Расщепление амидной связи цитруллин-РАВС катепсином В в лизосомах.	Цетуксима б (против EGFR).	3.9	рак поджелудочной железы MIA PaCa-2, PANC-1.	<i>In vitro u in vivo</i> (мышь).	[41]
TTZ-MC-NPV-MMAE	<p><u>17.</u></p>	Расщепление амидной связи валин-РАВС эластазой нейтрофилов человека в лизосомах или вне клетки.	Трастузума б (IgG1 против Her2).	4	рак молочной железы SK-BR3, MDA-MB-231.	<i>In vitro.</i>	[42]

<p>Б) β-Глюкуронидные линкеры</p>	<p>αCD19-mDPR-(PEGx)-glucuronid e-MMAE/ αCD30-mDPR-(PEGx)-glucuronid e-MMAE</p>	<p><u>18.</u></p> 	<p>Расщепление гликозидной связи бета-глюкуронидазой в лизосомах.</p>	<p>Антитела, сAC10 и hBU12 против CD30 и CD19.</p>	<p>8</p>	<p>Лимфомы Ходжкина (L540су, L428); Анапластическая крупноклеточная лимфома (Karpas299); лимфома Беркитта (Ramos); диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (SU-DHL-4, WSU-DLCL2 RL).</p>	<p><i>In vitro u in vivo</i> (мышь).</p>	<p>[43]</p>
	<p>Пролекарство, связывающее альбумин, реагирующее на β-глюкуронидазу</p>	<p><u>19.</u></p> 		<p>HSA.</p>	<p>1</p>	<p>Рак толстой кишки LS174T.</p>	<p><i>In vitro u in vivo</i> (мышь).</p>	<p>[44]</p>
	<p>LegoChem Bisciences -ADC (LCB-ADC)</p>	<p><u>20.</u></p> 		<p>Трастузумаб (IgG1 против Her2), линкированный последовательно,</p>	<p>2/4</p>	<p>Распространенные солидные опухоли, экспрессирующие Her2, рак молочной железы JMT-1, рак желудка N87.</p>	<p><i>in vitro u in vivo</i> (мышь); фаза 1 клинического исследования</p>	<p>[45]</p>

				узнаваемой фарнезилтрансферазой (легкая цепь и/или тяжелая цепь).			(NCT03944499).	
В) N-Ацетил-β-d-глюкозамидный линкер	β-GlcNAc-зависимое пролекарство, связывающее альбумин	<p>21.</p> <p>MMAE</p> <p>Альбумин</p>	Расщепление гликозидной связи N-ацетил-β-d-глюкозаминидазой.	HSA.	1	ройной негативный рак молочной железы MDA-MB-231.	<i>In vitro u in vivo</i> (мыши).	[46]
Г) Биоразлагаемый гидрофильный полимерный линкер	Трастузумаб-долафлексин, Fleximer®	<p>22.</p> <p>Антитело</p> <p>AF-NRA - гидроксипропиламид ауристатиона F</p>	Гидролиз эфирных связей.	Трастузумаб (IgG1 против Her2)	10–15 ауристатинов и 3–5 полимеров долафлексина на анти	31 линия раковых клеток, выделенная из рака молочной железы, желудка, легких и яичников.	<i>In vitro u in vivo</i> (мыши, яванские макаки).	[47][48]

					тело			
Радиационно-чувствительный линкер								
	<p>a) Alb-DMBA-SIL-MMAE/ б) mAb-DMBA-SIL-MMAE</p>	<p>23.</p> 	<p>Радиационно-индуцированное (8 Гр) радикальное гидроксирование с последующим 1,6-элиминированием 3,5-диметилбензилового спирта (DMBA) и последующая потеря саморазрушающейся линкерной каркасной группы.</p>	<p>a) HSA б) mab225 (против EGFR)</p>	<p>a) 0,12 б) 5,6</p>	<p>Клетки анапластического рака щитовидной железы (8505с), плоскоклеточный рак полости рта (MOC-2), аденокарцинома толстой кишки (MC38), аденокарцинома поджелудочной железы (iKRAS).</p>	<i>In vitro.</i>	[49]

1.2.2. Расщепляемые линкеры.

Стратегия создания расщепляемого линкера использует два основных типа механизма высвобождения терапевтического средства: химически лабильные линкеры, и ферментативно расщепляемые линкеры.

Химически лабильные линкеры включают кислотолабильные, дисульфидные и пероксид-лабильные линкеры [50]. Дисульфидные линкеры высвобождают лекарство за счет взаимодействия с меркапто-соединениями клетки. Пероксид-лабильные линкеры оказываются неустойчивы в окислительных условиях. Недостатками кислотолабильных линкеров являются неспецифическое высвобождение лекарств из-за кислой среды, обнаруживаемой в различных тканях, и нестабильность при длительной циркуляции внутри организма [51]. Сводная информация о типах линкеров, применяемых для присоединения монометилауристатинов E и F к белкам изложена в таблице 1.

1.2.2.1 Кислотолабильные (pH-чувствительные) линкеры

Кислотолабильные (pH-чувствительные) линкеры содержат *N*-ацилгидразоновую связь, которая чувствительная к кислоте. Такой тип линкеров относительно стабилен при нейтральном pH и гидролизуется в кислой среде (pH 5,5–6,2 в эндосомах и pH 4,5–5,0 в лизосомах). Конструкции такого типа встроены в препараты *Mylotarg* и *Besponsa* имеющиеся в продаже. Но, как показывают исследователи, эти линкеры не так стабильны в плазме, и, в силу этого, не так привлекательны, как другие расщепляемые линкеры [9]. Тут надо отметить, что в некоторых случаях медленное высвобождение нагрузки может дать положительные результаты. Поэтому, в случае данного типа линкеров, обычно используют только полезную нагрузку с умеренной цитотоксичностью, а высокотоксичная полезная нагрузка, используемая в случае ADC, укомплектованных ауристатинами, требует более стабильного линкера.

Авторы [15] разработали кислоточувствительный альбуминсвязывающий противораковый препарат на основе MMAE, имеющий сульфированный ароматический гидразид в качестве линкера между малеимидо-капроновой кислотой и ауристатином E. Как показали исследования, электроноакцепторная заряженная сульфогруппа, с одной стороны, улучшает растворимость пролекарства в воде, с другой стороны, делает стабильнее гидразоновый линкер в отношении гидролиза (таблица 1, структура 1).

Kratz et. al. разработали пролекарства, содержащие MMAE, функционализированный малеимидной группой и имеющие водорастворимый ароматический линкер (Sulf07), содержащий прочный, но чувствительный к кислой среде гидразоновый фрагмент (AE-

Keto-Sulf07 и AE-Ester-Sulf07, Рис. 4). Пролекарства AE-Keto-Sulf07 и AE-Ester-Sulf07 вводят в плазму через вену, где они быстро и селективно связываются через малеимидный остаток с боковой меркапто-группой Cys-34 циркулирующего в крови альбумина. Лекарство циркулирует в виде конъюгата альбумина, пока не достигнет опухолевой ткани, где высвобождается рН-зависимым образом [15].

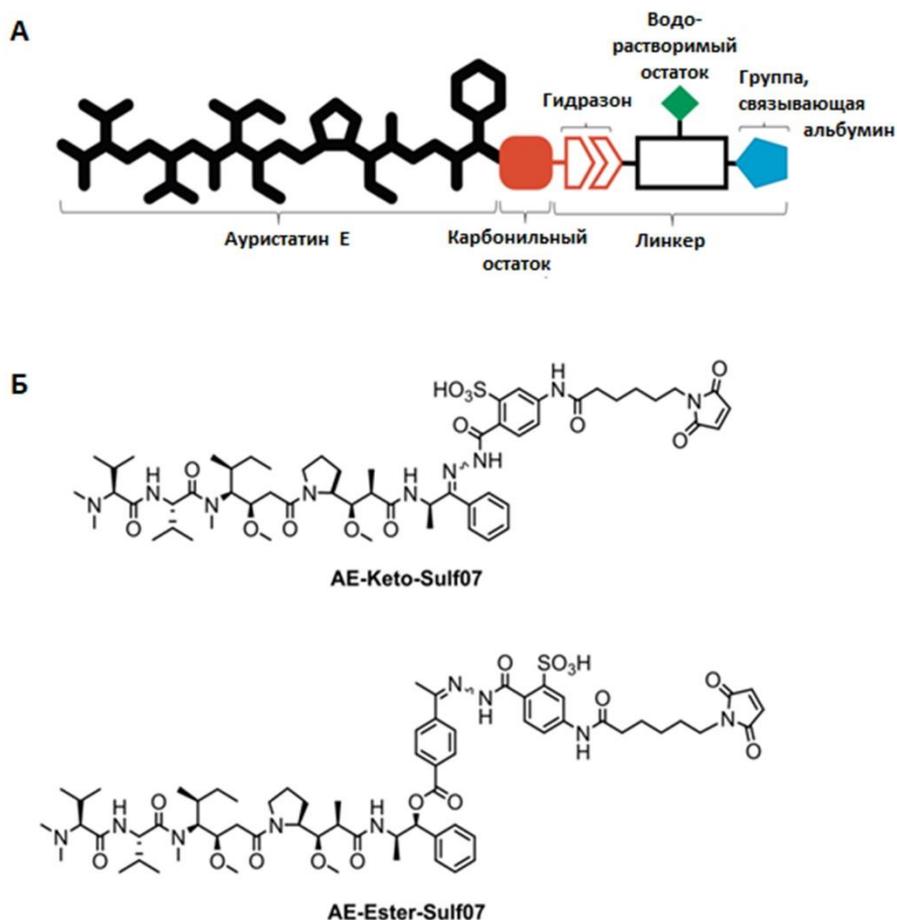


Рис. 4. А) Общая структура альбуминсвязывающих пролекарств ауристатина Е с кислоточувствительными свойствами. Б) химическая структура пролекарств AE-Keto-Sulf07 и AE-Ester-Sulf07 [15].

В эксперименте *in silico* авторы получили трехмерные координаты производных ауристатина Е, связанных с тубулином, путем редактирования соответствующих структур в программе SYBYL X-2.1.1. Они подтвердили, что AEKeto-Sulf07 и AE-Ester-Sulf07 четко вписываются в сайт связывания пептида тубулином, подобно MMAE. Таким образом, они способны вызывать ожидаемый эффект разрушения тубулина [15].

Так же была оценена скорость связывания AE-Keto-Sulf07 и AE-Ester-Sulf07 с циркулирующим альбумином *in vitro* в мышинной и в человеческой плазме. Около 91–99% обоих пролекарств соединялось с альбумином в течение 2 минут после инкубации.

Стабильность связанных с альбумином пролекарств определяли в течение 24 ч *in vitro* в моделируемых физиологических условиях (рН 7,4) и в кислых условиях (рН 4,1), которые имитируют кислую среду опухоли и лизосом / эндосом. HSA-AE-Keto-Sulf07 и AE-Ester-Sulf07, соответственно, высвобождали 1% и 4% лекарственных средств через 24 ч при физиологическом рН. При кислом рН наблюдалось высвобождение 21% и 90% лекарственного средства через 24 часа, в случае HSA-AE-Keto-Sulf07 и AE-Ester-Sulf07, соответственно [15].

Хотя пролекарства могут быстро связываться с альбумином в исследованиях *ex vivo* с использованием плазмы, эти эксперименты проводились в статических условиях, и было неясно, можно ли достичь полного связывания лекарства с альбумином в условиях потока крови внутри организма.

Противоопухолевую эффективность AE-Keto-Sulf07 и AE-Ester-Sulf07 *in vivo* оценивали на серии моделей ксенотрансплантата опухоли человека у мышей (клеточная меланома A375 и карцинома яичника A2780, немелкоклеточный рак легкого LXFA737 и LXFE937, выделенный от пациента, а также в ряде опухолей головы и шеи, так же выделенных от пациента). Терапевтические конъюгаты сравнивали с исходным ММАЕ. Хотя ММАЕ оказался в этих экспериментах практически лишен какой-либо противоопухолевой эффективности, за исключением клеточной модели LXFA737, оба альбуминсвязывающих пролекарства продемонстрировали противораковую эффективность, вызывающую статистически значимую частичную и/или полную регрессию опухоли как при небольших опухолях (130–150 мм³), так и при больших опухолях (270–380 мм³). Следует отметить, что длительные регрессии были достигнуты во всех протестированных моделях ксенотрансплантатов в течение 14 недель после инъекции.

AE-Keto-Sulf07 продемонстрировал очень хороший противоопухолевый ответ в широком диапазоне доз, 3,0–6,5 мг/кг (5–8 инъекций, каждые две недели). Кроме этого, было показано, что AE-Keto-Sulf07 хорошо переносился на моделях опухолевых тканей LXFA737 и LXFE937 трансплантированных мышам, но при использовании трансплантата опухоли A2780 наблюдались отдельные случаи смерти. В исследовании больших опухолей A2780 у одной мыши после достижения полной регрессии опухоли (19–44 день) наблюдался повторный рост опухоли, еще одну мышь пришлось подвергнуть эвтаназии из-за потери массы тела. В исследовании небольших опухолей A2780 одну мышь, получавшую более низкую дозу (3,0 мг/кг), пришлось подвергнуть эвтаназии из-за общего плохого состояния (42-й день), а еще одна мышь, получавшая более высокую дозу 5,0 мг/кг, внезапно умерла на 35-й день [15].

AE-Ester-Sulf07 провоцировал царапанье и укусы у мышей через две-три недели после начала лечения [52]. Препарат был высокоэффективен в дозах от 1,9 до 2,4 мг/кг (8 инъекций, раз в две недели) или 3,8 мг/кг (4 инъекции, еженедельно), но вызывал кумулятивное раздражение кожи из-за царапин и укусов [15]. Введение AE-Ester-Sulf07 в более высокой дозе, но с меньшей частотой, не снижало достигнутую противораковую эффективность и уменьшало раздражение кожи. Самая высокая степень кожной токсичности наблюдались в моделях NSCLC, и в модели рака яичников A2780. Только очень легкие неограничивающие кожные эффекты наблюдались в модели меланомы A375 и на модели почечной карциномы RXF631. Также наблюдалась потеря массы тела мышей в зависимости от типа опухоли [15].

Таким образом, оба препарата показали достаточную эффективность, на большинстве трансплантированных моделей опухолей и препарат AE-Keto-Sulf07 оказался более эффективен, чем AE-Ester-Sulf07. Такие результаты объяснялись неполным связыванием двух пролекарств с альбумином в плазме и меньшей устойчивостью AE-Ester-Sulf07 к гидролизу при физиологических значениях pH. Это означает неизбежную токсичность за пределами опухолевой ткани [15].

Авторы [16] использовали новый кислотолабильный бифункциональный линкер, содержащий с одной стороны малеимидный остаток, а с другой – бициклононин. Малеимидная часть линкера была задействована для конъюгации с рекомбинантным альбумином по остатку Cys-34. После чего, с помощью реакции необратимого азид-алкинового циклоприсоединения с бициклононином был присоединен олигонуклеотид, функционализированный тетразином. Затем, путем отжига с комплементарной олигонуклеотидной последовательностью, содержащей MMAE, была сделана сборка итоговой конструкции (таблица 1, структура 2). Авторы использовали именно бром-замещенный малеимид, так как бром, действуя как уходящая группа во время конъюгации с тиолом, способствует образованию более стабильных тиомалеимидов, тем самым предотвращая обратную реакцию Михаэля. Эта молекулярная сборка демонстрирует стабильность, модульную функциональность и рециркуляцию клеток, управляемую FcRn.

1.2.2.2. Дисульфидные линкеры

Дисульфидные линкеры могут разрушаться в восстановительной среде. Глутатион (GSH) представляет собой тиолсодержащий трипептид, концентрация которого в цитоплазме раковых клеток примерно в 1000 раз выше, чем в плазме. GSH может действовать как нуклеофил, атакуя дисульфидный мостик и освобождая цитотоксичную нагрузку.

Для связи β -субъединицы токсина STxВ с монометилауристатинами *Batisse C и др.* синтезировали три расщепляемых линкера, которые включают дисульфидную связь, и присоединены к монометилауристатинам либо через гидроксильную группу (в случае ММАЕ), либо с образованием «транс»-карбаматной связи через метиламиновый конец (как в случае ММАЕ, так и в случае ММАF) (таблица 1, структура 3). При расщеплении дисульфидной связи, соединяющей такой линкер с белком, происходит атака образовавшимся тиолом по карбаматному, либо карбонатному фрагментам с циклизацией линкерного участка и высвобождением монометилауристатина. Результаты этой работы показали, что линкер, содержащий карбонатный фрагмент, менее стабилен в растворе, чем тот, что содержит карбамат [17].

Ohri R и др. разработали пиридиндисульфидный линкер для присоединения ММАЕ по цистеиновым боковым радикалам антител с образованием дисульфидных связей (таблица 1, структура 4) [18]. Однако из-за большого разнообразия потенциально активных сайтов на поверхности антител, препараты ADC с дисульфидными связями имеют разные соотношения лекарственного средства к антителу, и, в силу этого, обладают большой гетерогенностью. В условиях гетерогенности конъюгатов становится сложно контролировать кинетику высвобождения полезной нагрузки и предотвращать преждевременное высвобождение молекул лекарственного средства в кровотоки.

1.2.2.3. Пероксид-лабильные линкеры.

Внеклеточный матрикс раковых тканей имеет большое количество активных форм кислорода, в следствие чего становится целесообразным применение линкеров, способных расщепляться в таких условиях.

Команда *N. Ashman* [19] разработала линкер, содержащий бороновую кислоту, и применила его для создания ADC, которое, отщепляя нагрузку, само в клетку не проникает. Бороновая кислота способна разлагаться под воздействием перекисных радикалов, высвобождая полезную нагрузку. Чтобы контролировать степень модификации антитела полезной нагрузкой и обеспечить сайт-специфическую конъюгацию антитела с ауристатином, исследователи использовали фрагмент дивинилпиримидина, присоединенного модифицированному бороновой кислотой ММАЕ с помощью алкин – азидном циклоприсоединении предназначенного для присоединения к цистеиновым остаткам антитела IgG (таблица 1, структура 5). Классический подход биоконъюгации с антителом заключается в восстановлении четырех дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями антитела. При этом образуется до восьми сульфгидрильных групп, которые будут в дальнейшем реагировать, например, с

малеимидным линкером, и это приведет к присоединению к антителу до восьми молекул полезной нагрузки. Использование дивинилпиримидинового фрагмента позволяет точно контролировать нагрузку, что приводит к высокостабильному ADC со степенью модификации равной 4. Задействованная в данной работе стратегия с использованием носителя, который, отщепив полезную нагрузку, сам по себе не проникает в клетку может оказаться малоприменимой в случае использования в качестве полезной нагрузки препаратов с плохим проникновением в клетки.

1.2.2.4. Ферментативно расщепляемые линкеры.

Чтобы ограничить высвобождение полезной нагрузки до интернализации и минимизировать внеклеточную деградацию, лизосомальные протеазы, присутствующие в высоких концентрациях, являются лучшими кандидатами на деградацию антираковых конструкций и, в частности, ADC. Среди них катепсин В, каспаза 3 и β -глюкуронидаза могут использоваться в качестве ферментов для разложения линкера.

В настоящее время, при создании препаратов на основе ауристатинов, наиболее успешным является применение пептидного фрагмента, расщепляемого катепсином В. Это цистеиновая протеаза, которая была обнаружена в поздних эндосомах и лизосомах млекопитающих. Она сверхэкспрессируется во многих раковых клетках. Многие, имеющиеся на рынке препараты, например, *Adcetris*, *Polivy*, *Padcev*, *Tivdak*, *Aidixi*, *Lumoxiti*, *Zynlonta* имеют пептидный линкер, расщепляемый катепсином В.

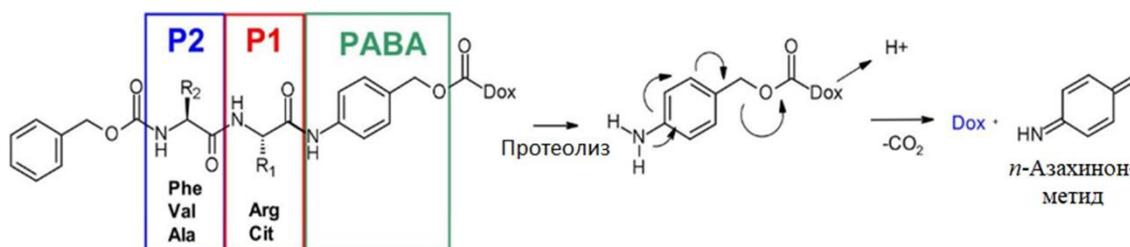


Рис. 5. Механизм высвобождения полезной нагрузки из конъюгата дипептид-РАВС-доксорубицин [53].

В качестве субстрата катепсина В можно использовать комбинацию расщепляемого дипептида (P1-P2) и *n*-аминобензилкарбамата, или *n*-аминобензилового спирта, соединенную с пролекарством [53]. В составе дипептида P1 — гидрофильный остаток (цитруллин или аргинин), а P2 — липофильный остаток (фенилаланин, валин или аланин). *n*-Аминобензиловый спирт или *n*-аминобензилкарбамат являются, структурными фрагментами линкера, облегчающими работу катепсина В. Причем, *n*-

аминобензилкарбамат (РАВА) может самопроизвольно элиминироваться в кислой среде, расщепляясь на углекислый газ и *n*-азахинонметид (рис. 5).

Дипептид Val-Cit считается наиболее часто используемым расщепляемым линкером в ADC из-за хорошей стабильности в плазме, особенностей высвобождения полезной нагрузки и простоты при химических манипуляциях. В нескольких одобренных ADC (*Adcetris* и *Polivy Tivdak*) в качестве линкера использовался малеимидапроил-валин-цитруллин-*n*-аминобензилкарбамат (mc-VC-PABC, Структура 6, таблица 1).

Тисотумаб ведотин (*Tivdak*), разработанный компаниями Seattle Genetics (Seagen) и *Genmab A/S*, представляет собой ADC, нацеленный на тканевой фактор TF-011. Он получил ускоренное одобрение FDA в сентябре 2021 года как первый препарат ADC для лечения рецидивирующего или метастатического рака шейки матки [54].

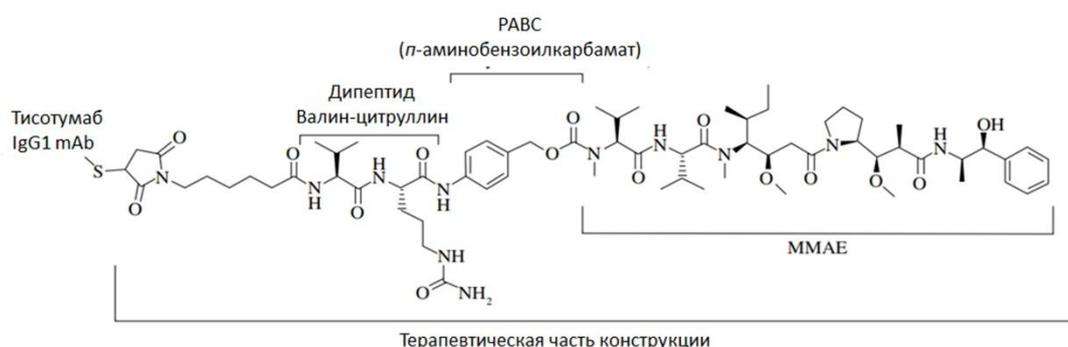


Рис. 6. Химическая структура тисотумаба ведотина [54]

Рекомендуемая доза тисотумаба ведотина составляет 2 мг/кг (максимум до 200 мг для пациентов с массой тела ≥ 100 кг) внутривенно один раз каждые 3 недели до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности. Снижение дозы или прекращение лечения могут потребоваться из-за побочных реакций, включая кератит, различные побочные эффекты на конъюнктиву, периферическую нейропатию, кровотечение и пневмонит.

Наиболее частыми нежелательными явлениями, связанными с лечением, в клинических исследованиях фазы I/II были алоpecia, диарея, носовое кровотечение, конъюнктивит, тошнота, нарушения со стороны глаз и периферическая невропатия, большинство из которых имели степень 1/2. Наиболее частыми нежелательными явлениями степени ≥ 3 были анемия, астения, гипокалиемия, повышение уровня аланинаминотрансферазы, лейкопения, одышка и острое повреждение почек. Однако, как сообщается, побочные реакции, в целом, безопасны и контролируемы [55][56][57].

При связывании малеимидного конца линкера mc-VC-PABC с антителом часто используют контролируемое частичное восстановление внутреннего дисульфидного мостика антитела с последующим добавлением mc-VC-PABC-MMAE /F для образования тиоэфир-связанного ADC со степенью модификации до 8 молекул полезной нагрузки на одну молекулу антитела[18] [24] [25][26] [27] [28],[29][30][58][59][60][61][62].

Малеимидная часть линкера mc-VC-PABC может быть ковалентно связана с любым белком-носителем, которым может являться как антитело, так и альбумин (таблица 1, структура 7). Известно, что использование этого линкера не ослабляет специфическое связывание белка-носителя с клетками-мишенями [20].

Liu X и др. создали модель лекарственного препарата MMAE, который был конъюгирован *ex vivo* с Cys-34 рекомбинантного альбумина через чувствительный к катепсину В дипептидный линкер (рис. 7). Сконструированные конъюгаты содержали разное количество полезной нагрузки: ALDC1 (соотношение белок : MMAE = 1:1) и ALDC3 (соотношение 1:3). Для сравнения *ex vivo* и *in vivo* стратегии авторами был синтезирован, так же, малеимидный аналог ауристатиона (MMAE-MAL), предназначенный для связывания с эндогенным альбумином после введения в кровотоки [31].

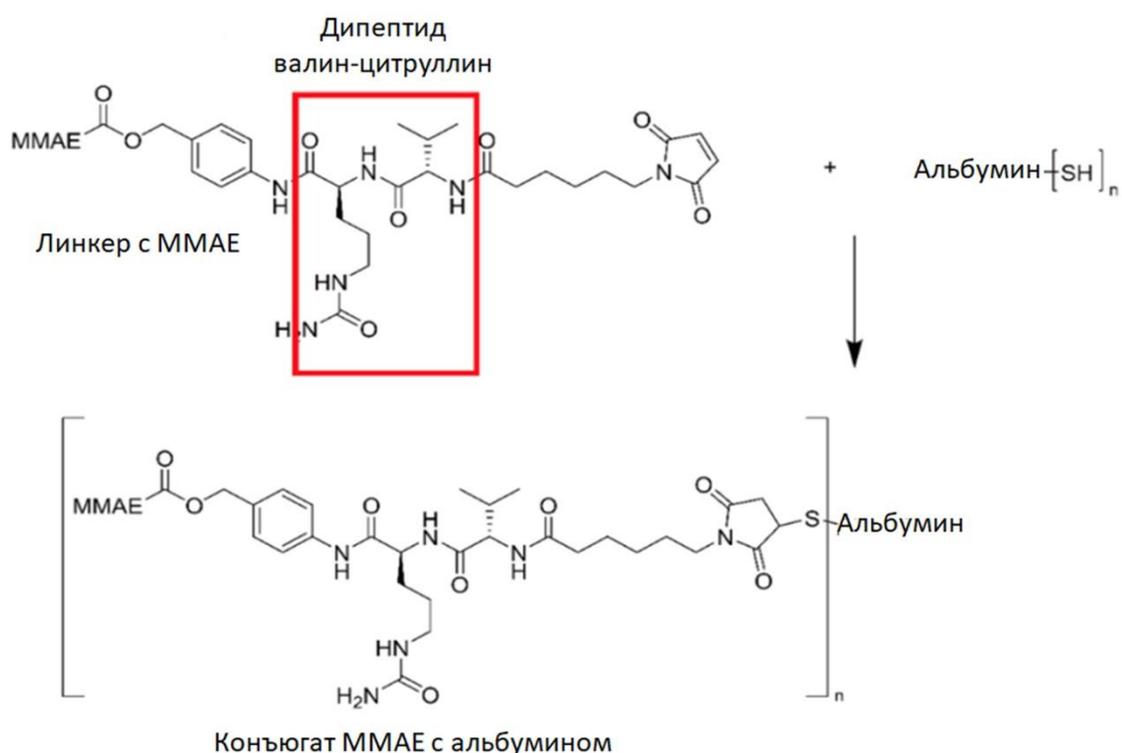


Рис. 7. Схема синтеза конъюгата альбумина с MMAE [31].

Ex vivo стратегия подразумевает присоединение терапевтической нагрузки к белку-носителю до помещения конструкции в кровотоки. В случае *in vivo* стратегии,

химиотерапевтическая молекула, имеющая активированный линкер, присоединяется к белку носителю прямо в кровотоке.

В эксперименте по оценке клеточной токсичности *in vitro* на двух типах клеточных линий рака поджелудочной железы человека (MIA PaCa2 и PANC1), после конъюгации MMAE с альбумином значительно увеличилась токсичность ауристатина в отношении раковых клеток при его присоединении к альбумину (токсичность ALDC1 в отношении раковых клеток MIA PaCa2 была в 200 раз выше, чем у свободного MMAE). Так же увеличилась специфичность ауристатина в составе конъюгатов (эквивалентная доза свободного MMAE в отношении нераковых клеток HUVEC была в 300000 раз токсичнее, чем в случае конъюгата ALDC1) [31].

Кроме этого, авторы сравнили общее воздействие MMAE в плазме крови с течением времени для конъюгатов: MMAE, MMAE-MAL, ALDC1 и ALDC3. Результаты показывают, что в группах MMAE-MAL и ALDC3, пептид MMAE с большей вероятностью преждевременно высвобождается в плазме. Это приводит к увеличению скорости клиренса по сравнению с ALDC1. Так же обнаружено, что конъюгаты MMAE с альбумином, конъюгированные *ex vivo*, более стабильны в плазме, чем те, что сделаны с использованием MMAE-MAL *in vivo* [31].

В работе авторов *Huiyu Hu и др.* человеческий сывороточный альбумин был модифицирован *N*-гидроксисукцинимидными эфирами флуоресцентных красителей Alexa Fluor 555 или Alexa Fluor 647, и, затем, конъюгирован с малеимидным аналогом MMAE, содержащим валин-цитрулиновый спейсер. В экспериментах *in vitro* на клетках рака щитовидной железы человека конъюгат альбумина достигал такую же цитотоксичность как свободный MMAE только если использовать его в более высоких концентрациях в эквиваленте MMAE. Однако в эксперименте по токсичности *in vivo* на иммунокомпетентных мышах, несущих трансплантированные опухолевые клетки щитовидной железы человека, свободный MMAE не влиял на объем опухоли, в то время как эквимольный Alb-vc-MMAE уменьшал все опухоли более чем на 90%, и при этом не создавал никаких явных токсических эффектов. Авторы также обнаружили, что раковые клетки усиливают усвоение альбуминсвязывающих препаратов, регулируя макроцитоз, управляемый онкогенами [63].

Темминг К. и др. создали конъюгат MMAE с человеческим сывороточным альбумином, модифицированный с помощью циклического пептида c(RGDfK) для нацеливания на ангиогенные эндотелиальные клетки, экспрессирующие $\alpha\beta 3$ -интегрин. Были синтезированы 4 конъюгата с использованием катепсин-расщепляемого линкера mc-vc-

РАВС для присоединения MMAE к конструкции и спейсера с короткой алкильной цепью либо полиэтиленгликоля для связывания пептидов RGD: RGD-PEG-MMAE-HSA, RGD-MMAE-HSA, RGD-PEG-MMAF-HSA и RGD-MMAF-HSA (рис. 8). При этом авторы использовали 2-иминотиоалканы для модификации остатков лизина и увеличения количества меркаптогрупп в составе белка. Было достигнуто соотношение SH / альбумин равное 4. Это позволило авторам присоединить к конструкции терапевтического пептида [64].

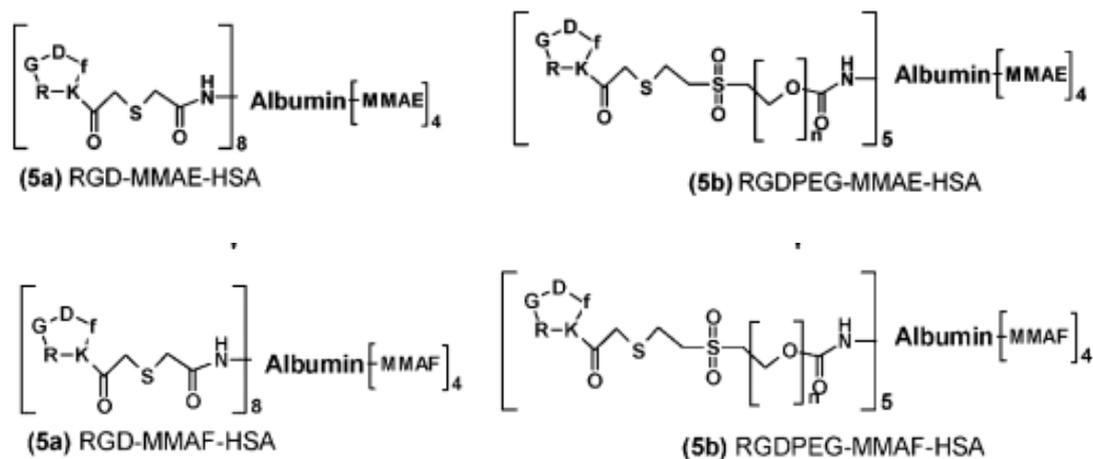


Рис. 8. Структура RGD-MMAE-HSA, RGDPEG-MMAE-HSA, RGD-MMAF-HSA, RGDPEG-MMAF-HAS [65].

В экспериментах по цитотоксичности на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) и опухолевых клетках толстой кишки C26, экспрессирующих RGD-направленный интегрин $\alpha v \beta 3$, было показано, что конъюгаты могут с высокой эффективностью проникать в клетки и обладают хорошей селективностью в отношении опухоли. Конъюгаты с MMAF оказались более эффективными, чем конъюгаты с MMAE. Так же было отмечено, что цитотоксичность конъюгатов имеющих более короткие алкильные мостики, соединяющие альбумин и RGD (RGD-MMAE-HSA и RGD-MMAF-HSA) была в 3,5-16 раз выше чем у конъюгатов, имеющих в структуре PEG (RGD-PEG-MMAE-HSA и RGD-PEG-MMAF-HSA) [66]. Однако противоопухолевые эффекты этих конъюгатов *in vivo* авторами данной работы не оценивались.

Doronina S. O. и соавт. сравнили стабильность двух конструкций (mAb-Val-Cit-РАВС-MMAE и mAb-Phe-Lys-РАВС-MMAE), одна из которых содержала валин-цитрулиновый дипептидный, а вторая – фенилаланил-лизиновый фрагмент (таблица 1, структура 8). Авторы обнаружили, что первый тип конструкции более стабилен в плазме и имеет более длительный период полувыведения препарата [9].

Другой расщепляющий фермент каспаза-3 активируется в условиях ионизирующего облучения и существует недолго. Это является, скорее, положительным моментом при создании соответствующих терапевтических конструкций, так как это улучшает селективность воздействия лекарства.

Chung SW и др. создали линкер, расщепляемый каспазой-3, содержащий пептид Ac-Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp, функционализированный малеимидом по боковому радикалу Lys, и несущий MMAE, присоединенный по С-концу через самоэлиминирующийся линкер [32] (таблица 1, структура 9 и рис. 9). Эти авторы предложили стратегию применения «радиационно-индуцированной химиотерапии, направленной на апоптоз» для лечения тройного негативного рака молочной железы. При лучевой терапии в опухолевых клетках активируются каспазы. Наиболее очевидной является активация каспазы-3, которая может расщеплять пролекарства, связанные с альбумином, и высвобождать цитотоксические агенты.

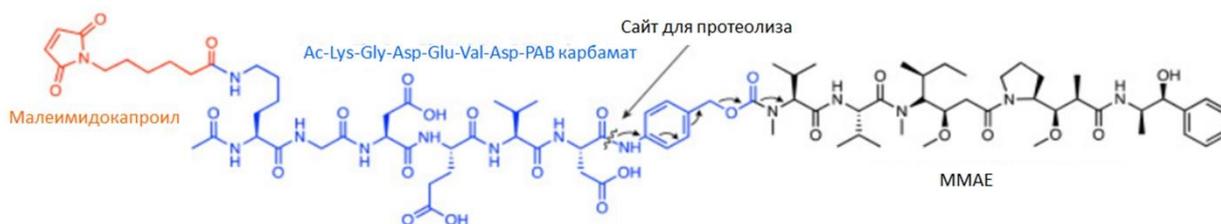


Рис.9. Химическая структура MPD02 [32]

Имея малеимидную группу, MPD02 может *in vitro* ковалентно связываться с альбумином в течение 5 минут инкубации. В присутствии каспазы-3 итоговый конъюгат (Alb-MPD02) в течение 60 минут почти полностью метаболизируется с образованием свободного MMAE. Авторы продемонстрировали близкие уровни токсичности MPD02 и свободного MMAE на клеточных линиях тройного негативного рака молочной железы (MDA-MB-231 и HCC70).

В экспериментах *in vivo* токсичность данной конструкции была проверена на двух различных моделях ксенотрансплантата тройного негативного рака молочной железы. Эксперименты показывают, что MPD02 может распределяться по организму в течение 24 часов и преимущественно накапливаться в опухолях в течение 96 часов. Полное подавление роста опухоли было достигнуто после 3 недель лучевой терапии при инъекции MPD02 в дозе 1 мг/кг раз в два дня и облучении 6 Гр в неделю. Однако, при более высокой дозе препарата (1,5 мг/кг) в экспериментальной группе мышей наблюдалась значительная потеря веса. Это может быть связано с гидролизом амидной связи в линкере

карбоксилэстеразой плазмы крови грызунов или с катаболизмом альбумина, приводящим к неспецифическим высвобождению ММАЕ [32].

Наличие малеимидной функции для присоединения к белку-носителю (в данном случае, к альбумину) подразумевает использование цистеиновых остатков белка. Классической и довольно часто используемой стратегией увеличения количества SH групп в белках является частичное восстановление дисульфидных мостиков. Однако эта стратегия имеет множество недостатков, особенно в применении к конструированию ADC. Во-первых, исчезновение межцепочечных дисульфидных связей ведет к нестабильности структуры белка, во-вторых, сложно добиться селективности в отношении восстанавливаемого сайта, что приводит к образованию гетерогенных препаратов ADC с узким терапевтическим окном. В-третьих, классические малеимидные конъюгаты не очень стабильны в плазме крови, что приводит к переносу полезной нагрузки на цистеин-содержащие белки плазмы, по большей части, это альбумин [67].

Чтобы синтезировать более гомогенные и стабильные конъюгаты, была предложена серия соединений, ремоделирующих дисульфидные мостики, способных сохранить структурные характеристики антитела нетронутыми, одновременно обеспечивая функционализацию целевого белка. *Zhou W и др.* [33] разработали новый тиоэфирный линкер на основе малеимида. В линкер были введены две уходящие группы 4-меркаптобензоилморфолина для улучшения растворимости в воде и снижения нуклеофильности тиоловых групп (таблица 1, структура 10). Кроме того, дифторфенильная часть линкера может ускорять полный гидролиз малеимида и стабилизировать конъюгацию к антителу. Авторы работы продемонстрировали, что эта система связей значительно увеличивает скорость интернализации препаратов ADC.

Juen L и др. [34][35] заменили капролильную группу малеимида (таблица 1, структура 11) на трифункционализированный ди(бромметил)пиридиновый каркас. Все сконструированные с помощью этого линкера ADC показали стабильность в плазме крови и контролируемую модификацию полезной нагрузкой.

Группа *Badescu* в 2014 году сообщила о новой сайт-специфической стратегии конъюгации ауристатинов с антителами (таблица 1, структура 12). Было продемонстрировано, что новые биссульфоновые реагенты способны алкилировать дисульфидные связи как антител, так и их фрагментов, с минимальным влиянием на их связывание антигеном [36][37].

Команде *Maо Y.* Удалось с получить гомогенный ADC со степенью модификации антитела, равной 4 остатка MMAE на одно антитело, используя валин-цитрулиновый линкер, имеющий бис(винилсульфонил)пиперазиновый фрагмент. Эта функциональная группа позволяет предотвратить нарушение дисульфидных связей в шарнирной области антитела, образуя поперечные связи с одной тяжелой цепью [38] (таблица 1, структура 13). Однако, поскольку хиральный центр бис(винилсульфонил)пиперазина влияет на эффективность конъюгации, авторы предложили использовать фенилдивинилсульфонамид. Как было показано, с помощью этой функциональной группы можно получать стабильные и высокооднородные конъюгаты [39] (таблица 1, структура 14).

В рамках сходной стратегии модификации антитела, *Javaid F u др.* использовали линкер, снабженный дибромпиридазиндионой функциональной группой для связывания с антителом и циклический алкин для взаимодействия с модифицированным азидо-группой валин-цитрулиновым фрагментом, соединённым с MMAE [40] (таблица 1, структура 15). При этом стадия азид-алкинового циклоприсоединения является заключающей на пути связывания антитела с ауристатином. Авторы [41] использовали для присоединения к антителу тот же функциональный фрагмент, что и *Javaid F u др.* (таблица 1, структура 16), но при этом стадия взаимодействия дибромпиридазиндионой функциональной группы с антителом проводится в последнюю очередь, что дополнительно повышает селективность модификации антитела.

В 2022 году *Amar I .A. M. u др.* разработали новый расщепляемый линкер, содержащий последовательность Asn-Pro-Val (NPV), чувствительную к эластазе нейтрофилов человека, сверхэкспрессируемой в микроокружении опухолей (таблица 1, структура 17). Для связывания MMAE с антителом использовался линкер, снабжённый диброммалеимидным остатком. Высокая селективность расщепляемого пептидного линкера, содержащего последовательность NPV, была подтверждена экспериментаторами *in vitro* [42].

Хотя появилось множество линкеров, имеющих расщепляемые пептидные фрагменты и функциональные группы, позволяющие специфическое связывание с дисульфидными связями антитела, все еще необходимо обратить внимание на следующие вопросы: 1) следует использовать различные оптимизированные условия реакции, чтобы избежать дисульфидного обмена во время процесса связывания; 2) В условиях восстановления дисульфидной связи следует, в последствии, различать восстановленный дисульфид и тиольную группу, которая была свободная до восстановления; 3) Необходимо

решить проблему плохой растворимости мостикового реагента в воде. Эти проблемы в плане использования пептидных расщепляемых линкеров не решены до конца.

1.2.2.5. Линкеры, расщепляемые β -глюкуронидазой.

β -Глюкуронидаза представляет собой фермент класса гликозидаз, которые катализируют гидролиз остатков β -глюкуроновой кислоты и широко распространены в лизосомах и строме опухоли. Исследователи из *Seattle Genetics* впервые в 2006 году предложили использовать линкер с фрагментом β -глюкуроновой кислоты, прикрепленный к саморазрушающемуся спейсеру.

Субстрат β -глюкуронидазы, β -глюкуроновая кислота, очень гидрофилна. Известно, что, если гидрофобность линкера снижается, то снижается и агрегация во время процесса конъюгации полезной нагрузки с антителом, таким образом можно достичь высокой степени модификации и снизить скорость клиренса ADC. Поэтому, такие линкеры демонстрируют низкие уровни агрегации, высокую стабильность в плазме и высокую эффективность *in vivo*. Однако есть один нюанс: известно, что препараты ADC со степенью модификации 6 или 8 молекул полезной нагрузки на одну молекулу антитела оказываются менее эффективными на моделях опухолей *in vivo*, чем ADC с более низкой степенью модификации (гомогенное или гетерогенное среднее значение степени модификации равно 4).

Burke PJ и др. усовершенствовали линкер β -глюкуроновой кислоты. Они снабдили малеимидной функцией разветвленный полимер PEG12 и присоединили его через расщепляемый глюкуронидазой линкер к MMAE (таблица 1, структура 18). Конъюгировав такую конструкцию с антителом, авторы получили гомогенный препарат ADC со степенью модификации равной 8. Было продемонстрировано, что полимер имел фармакокинетический профиль, аналогичный профилю неконъюгированного исходного антитела, а так же наблюдались более низкие уровни гепатотоксичности по сравнению с контрольным препаратом ADC, содержащим непегилированный линкер [43].

Renoux B и др. нитрозилировали ароматическое звено присоединенное к глюкуроновой кислоте, чтобы увеличить скорость саморазрушения [44]. (таблица 1, структура 19)

Rapot et al. добились более хороших результатов, создав новые противораковые пролекарства, состоящие из MMAE, саморазрушающегося линкера, несущего гидрофильную боковую цепь с малеимидной функциональной группой на конце и глюкуронидного триггера (рис. 10). Попав в кровоток, такие молекулярные конструкции

ковалентно связываются с плазматическим альбумином и пассивно накапливаются в опухолях в течение 3-х часов [44]. β -Глюкуронидаза, которая сверхэкспрессируется в опухолях, катализирует отщепление глюкуронидного триггера, после этого происходит высвобождение MMAE за счет перемещения электронных пар в самоуничтожающемся линкере (показано на рисунке 10 синими стрелками).

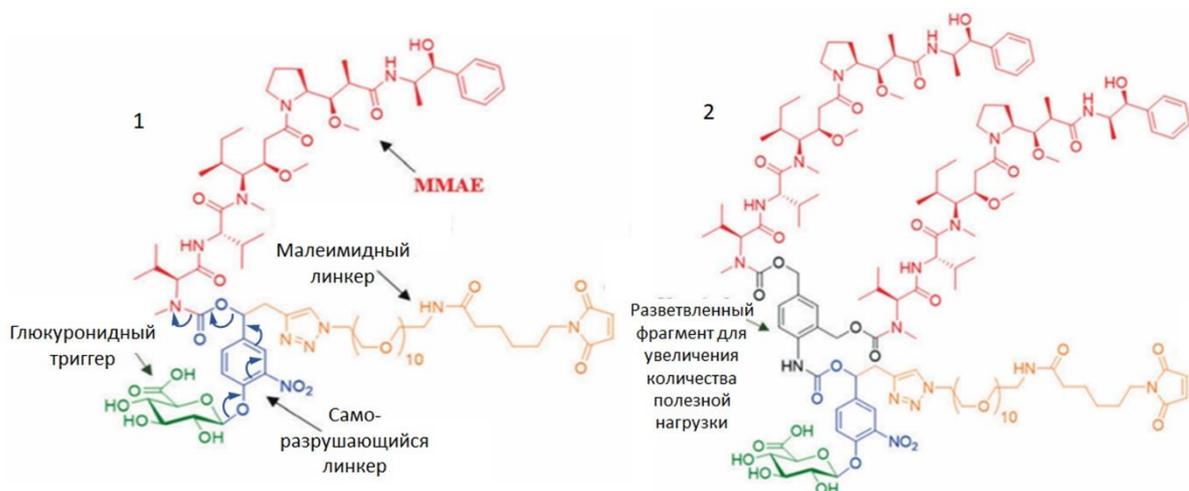


Рис. 10. Структуры пролекарств на основе MMAE, связывающих альбумин, реагирующих на β -глюкуронидазу [44] Красный цвет – MMAE, синий цвет – самоуничтожающийся линкер, зеленый цвет – глюкуронидный остаток, черный цвет – фрагмент, необходимый для увеличения количества присоединенного ауристатина. Синими стрелками показан механизм отщепления саморазрушающегося линкера.

В экспериментах *in vitro* во время инкубации при 37 °С пролекарства 1 и 2 (рис. 10) полностью связывались с HSA в течение 1.5 и 3 часов соответственно. В отсутствие β -глюкуронидазы макромолекулярный конъюгат пролекарства 2 с HSA оказался стабильным с течением времени. При добавлении в реакционную среду β -глюкуронидазы, время полного высвобождения MMAE из связанных с HSA пролекарств 1 и 2 составляло 1 и 5 ч, соответственно. Быстрое высвобождение MMAE из аддуктов позволяет избежать диффузии неактивного интермедиата за пределы участка опухоли [44][68].

В эксперименте по оценке цитотоксичности пролекарств 1 и 2 на клетках рака толстой кишки LS174T, доза пролекарств 5 нМ не вносила изменений в течение 3 дней лечения. Однако, при добавлении к клеточной культуре β -глюкуронидазы, размер колонии LS174T уменьшался в результате ферментативной активации обоих пролекарств. Этот эффект был более выражен с пролекарством 2 из-за более успешного высвобождения из него MMAE [44].

При оценке противоопухолевой активности *in vivo* у бестимусных мышей, несущих ксенотрансплантаты подкожной эпидермальной карциномы ротовой полости человека опухоли (KB), было проведено сравнение эффективности пролекарства 1 и конъюгата фолиевая кислота-ММАЕ, так как эта модель опухоли очень чувствительна к фолиевой кислоте. По сравнению с характеристиками конъюгата фолиевая кислота-ММАЕ, эффективность доставки пролекарства 1 в микроокружении опухоли оказалась гораздо выше. При дозе 0,77 мг/кг (в эквиваленте ММАЕ) противоопухолевая эффективность пролекарства 1 была заметно лучше, чем наблюдаемая с другими тестируемыми молекулами, и препарат хорошо переносился животными без потери массы тела [68].

При дозе 1,54 мг/кг (в эквиваленте ММАЕ) пролекарство 1 проявляет выдающуюся терапевтическую эффективность в отношении ортотопических тройных негативных опухолей молочной и поджелудочной желез (излечивалось 50% мышей). Пролекарство 2 в этом эксперименте проявляло умеренную активность (33% излеченных мышей) [68].

Далее соединения 1 и 2 вводили внутривенно (0,77 и 1,54 мг/кг в эквиваленте ММАЕ, соответственно) бестимусным мышам, несущим подкожные ксенотрансплантаты колоректальной аденокарциномы LS174Т. Исходный препарат ММАЕ так же вводили дозой 0,50 мг/кг. Все испытанные соединения проявляли значительную противоопухолевую активность без обнаруживаемых побочных эффектов или потери массы тела. Однако димерное пролекарство 2 (рис. 10) проявляло меньшую эффективность в плане снижения роста опухоли по сравнению с соединением 1. Вероятно, это можно объяснить неполным связыванием пролекарства 2 с плазматическим альбумином в кровотоке, или сложным механизмом саморазрушения линкера, задерживающим высвобождение лекарственного средства после запускаемой глюкуронидом ферментативной активации, либо диффузией интермедиатов за пределы опухоли [44].

Однако саморазрушающийся линкер должен обладать достаточной стабильностью в плазме крови. Поэтому *Shin.SH* и др. использовали амидный фрагмент как электроноакцепторную группу в ароматическом линкере, несущем β-глюкуроновую кислоту и ММАЕ. Такая электроноакцепторная группа улучшает стабильность линкера (таблица 1, структура 20). Кроме того, авторы задействовали интересный способ присоединения этой конструкции к антителу чрез использование присоединенных к антителу дополнительных аминокислотных последовательностей, которые могут распознаваться фарнезилтрансферазой. Таким образом, становится возможным с помощью фарнезилтрансферазы присоединить к антителу изопренилпирофосфатный фрагмент,

который, в свою очередь, может быть присоединен через оксимную связь с пегилированной ароматикой саморазрушающегося линкера [45].

Такая стратегия была задействована при создании такого ADC, как -ADC LCB14-0110 (LegoChem Bisciences)

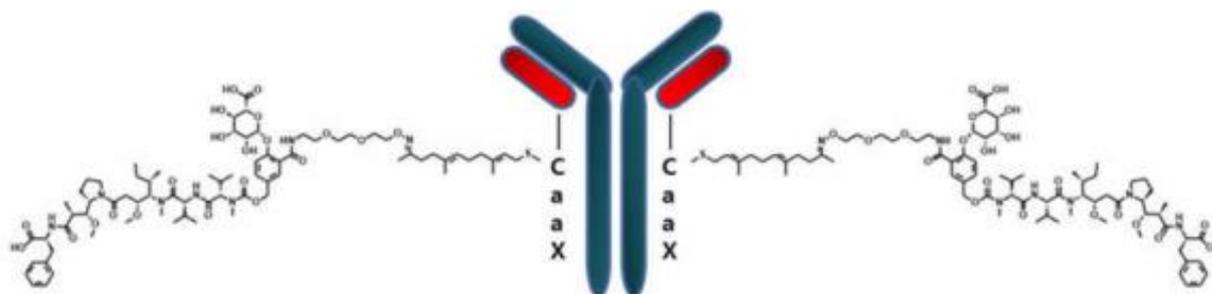


Рис. 11. Химическая структура LCB14-0110 [69].

Этот ADC, нацеленный на рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2), имеет в своём составе трастузумаб, монометилауристатин F и сложный расщепляемый линкер [45]. В данное время эта конструкция проходит фазу I исследования LCB-ADC1/LCB14-0110/FS-1502 (NCT03944499) Результаты этого исследования будут опубликованы в 2025 году [70].

1.2.2.6. Линкер, расщепляемый N-ацетил- β -d-глюкозаминидазой.

Rémi Châtre и др. [47] продемонстрировали, что концентрация N-ацетил- β -d-глюкозаминидазы в опухолевой ткани выше, чем в здоровой. У мышей, которым были пересажены клеточные линии рака шейки матки человека и трижды негативного рака молочной железы, были обнаружены высокие концентрации этого фермента, и они были выше, чем концентрации β -глюкуронидазы. Таким образом, авторы синтезировали альбумин-связывающее пролекарство, реагирующее на N-ацетил- β -d-глюкозаминидазу. Линкер пролекарства состоит из малеимид-функционализированного PEG10 присоединенного к саморазрушающемуся нитрозилированному фрагменту, несущему MMAE и N-ацетилглюкозамид (таблица 1, структура 21).

Недавно авторы [46] использовали производные дейтерированных моносахаридов (D₂-этил- β -d-галактопиранозид, D₄-этил- α -1-фукопиранозид, D₅-этил- β -d-глюкуронид и ¹³CD₅-этил-N-ацетил- β -d-глюкозамин), как зонды, предназначенные для индикации активности соответствующих гликозидаз в микроокружении опухоли. Эта рабочая группа обнаружила, что ацетилглюкозидаза сверхэкспрессируется в атимических голых мышах, подкожно инъецированных трансплантатами клеточной линии рака шейки матки человека. Они использовали тот же метод для замены глюкуронидного триггера вышеуказанного

пролекарства, что и синтезированный авторами [15] и синтезировали альбумин-связывающее пролекарство, реагирующее на ацетилглюкозидазу, для селективной доставки MMAE в микроокружение опухоли. Было продемонстрировано, что препарат проявляет значительный терапевтический эффект на ортотопические тройные негативные опухоли молочной железы. у мышей.

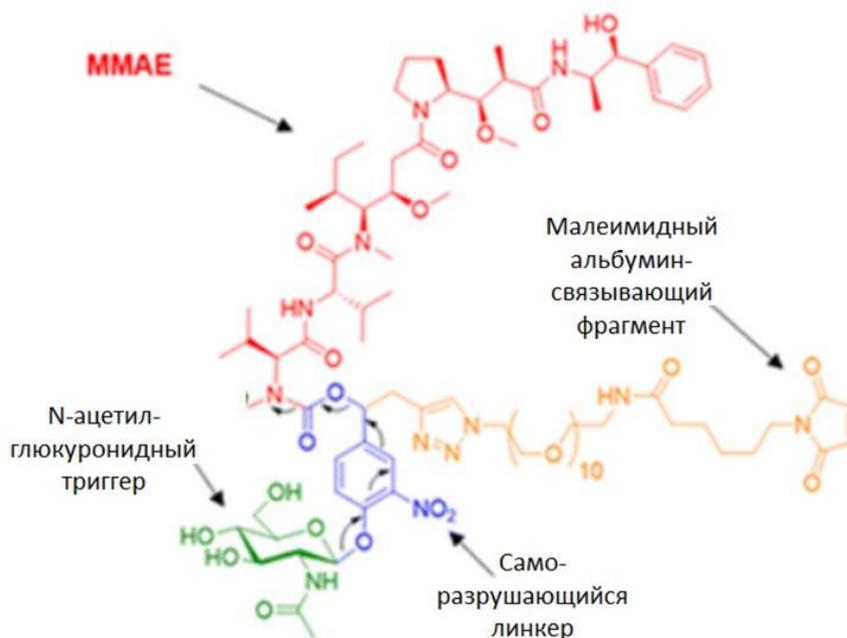


Рис. 12. а) - Структура β -GlcNAc-чувствительного пролекарства, связывающего альбумин.[46].

Группа исследователей [46] продемонстрировали *in vitro*, что препарат (рис. 12) можно конъюгировать с альбумином в течение 2 часов на 90%. В присутствии ацетилглюкозидазы MMAE полностью высвобождается в течение 3 часов. Конъюгированное лекарственное средство затем оставалось стабильным в отсутствие ацетилглюкозидазы, и после 22 часов инкубации не наблюдалось высвобождения MMAE. В экспериментах на линиях клеток рака шейки матки человека и тройного негативного рака молочной железы пролекарство могло проявлять токсичность, аналогичную свободному MMAE, при активации β -GlcNAc, продуцируемым опухолевыми клетками.

В исследованиях *in vivo* у 66% бестимусных мышей с ортотопическими тройными негативными опухолями молочной железы наблюдалась полная ремиссия после внутривенных инъекций 4 мг/кг -1 каждые две недели в течение 63 дней [46].

1.2.2.7. Биоразлагаемый гидрофильный полимерный линкер.

S. M. Clardy и др. предложили использовать в качестве линкера, соединяющего антитело и MMAF сложный полимер, включающий в себя несколько мономеров различной

структуры (таблица 1, структура 22). Средние относительные количества каждого мономера воспроизводимы и контролируются стехиометрией реакций синтеза этого полимера, а также хроматографической очисткой промежуточных продуктов и конечного материала. В среднем каждый полимер долафлексина, конъюгированный с антителом, состоит из следующего относительного количества мономеров: примерно 1–2 мономера, содержащих малеимидный фрагмент, конъюгированный с антителом через остатки цистеина; приблизительно 35 незамещенных мономеров, которые обладают высокой гидрофильностью из-за наличия гидроксильных и ацетальной группосновной цепи; примерно 8–10 мономеров, которые включают фрагмент β-аланина, имеют отрицательный заряд при физиологическом pH и способствуют гидрофильности; приблизительно 0–1 мономеров, в которых малеимидный фрагмент не подвергался биоконъюгации с антителом и был кэпирован в виде аддукта цистеина; и примерно четыре мономера, которые включают полезную нагрузку в виде MMAF, ковалентно присоединенную к основной цепи полимера через линкер, содержащий сложноэфирную связь. ADC, содержащие этот полимер, проявляют повышенную эффективность *in vitro* и *in vivo* на моделях ксенотрансплантатов опухолей [48].

Эта стратегия была задействована при создании ADC, как Долафлексин

Конъюгат антитело-лекарственное средство XMT-1522 (платформа Dolaflexin) состоит из моноклонального антитела IgG1 человека (HT-19), направленного против рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2) и новой цитотоксической полезной нагрузки на основе ауристатиона: гидроксипропиламида ауристатиона F (AF-NPA), соединенной с IgG1 через биоразлагаемый гидрофильный полимерный линкер (рис. 13). Конъюгат XMT-1522 избавлен от основных недостатков наиболее распространенных платформ ADC за счет двух ключевых особенностей: 1) соотношение терапевтический пептид: антитело в данном препарате составляет в среднем 12 к 1, что позволяет XMT-1522 лечить солидные опухоли с низкой экспрессией HER2; 2) в случае этой платформы, терапевтическая конструкция обладает контролируемым эффектом свидетеля (эффект свидетеля - механизм, при котором во время терапии погибают соседние с опухолью здоровые клетки, даже рецептор-негативные). Это обеспечивает большую системную переносимость данного средства. Внутри клеток-мишеней AF-NPA подвергается метаболическому превращению в сильнодействующий ауристин F, который, сам по себе, практически не способен проходить через мембрану клеток [47], что, в свою очередь, уменьшает эффект свидетеля.

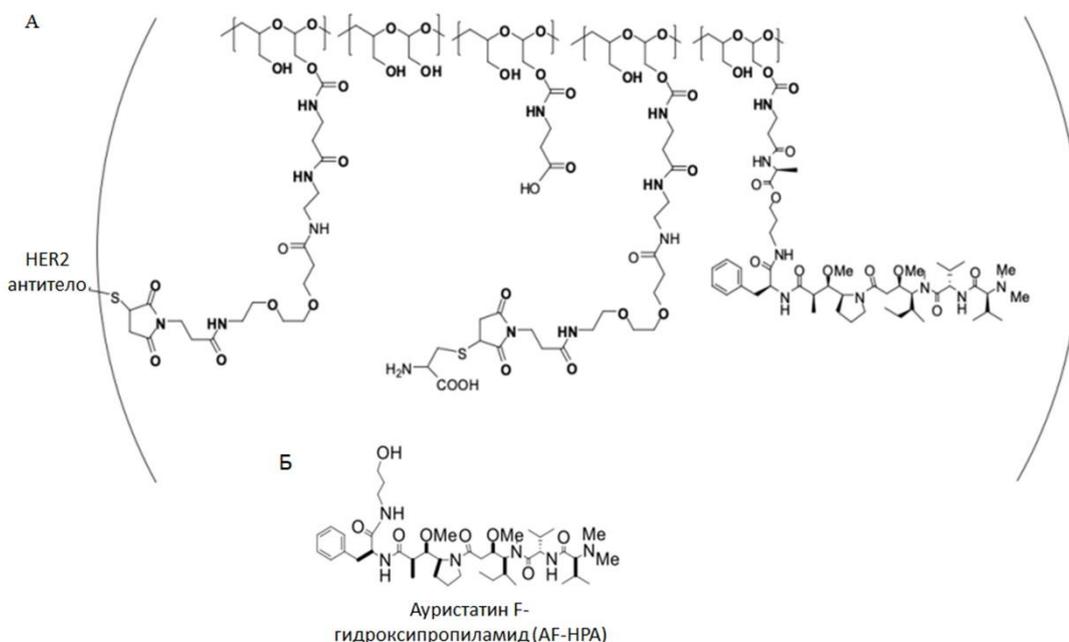


Рис. 13. (А) Структура XMT-1522. (В) Структура AF-NPA [48].

Препарат XMT-1522 был включен в фазу I клинического исследования (ClinicalTrials.gov, NCT 02952729). Однако, в июле 2018 г. клиническое исследование фазы I для XMT-1522 было приостановлено из-за смертельных случаев, возможно связанных с его применением, и возобновилось в сентябре 2018 г [71].

1.2.2.8. Радиационно-чувствительный линкер.

Опухоли содержат гипоксические области, которые появляются в результате формирования патологического кровоснабжения. Вследствие этого развивается устойчивость опухолевых клеток к лечению, что стимулирует поиск препаратов, повышающих чувствительность опухолей к терапии. Высвобождение лекарства может происходить через линкеры, возбуждаемые ионизирующим излучением, которые могут выделять токсичные лекарства даже в условиях гипоксии. *JM. Quintana и др.* создали линкер, имеющий фрагмент 3,5-диметилбензилового спирта, который подвергается удалению при радикальном гидроксильном иницировании клинически значимыми дозами рентгеновского облучения в условиях гипоксии (таблица 1, структура 23). Как показали авторы, это приводит к более чем 50% локализованному высвобождению MMAE и >2000-кратному увеличению цитотоксичности препарата. Общая конструкция линкера обеспечивает гибкость как в плане присоединения к транспортной молекуле, так и к полезной нагрузке и обещает широкое применение в терапевтических целях при лечении гипоксических опухолей [49]. *Fu Q и др.* предложили использовать 3,5-дигидроксibenзилкарбамат в качестве группы, реагирующей с гидроксильными

радикалами, генерируемыми облучением. Гидроксильное окисление осуществляется в пара/орто-положении с последующим 1-4- или 1-6-элиминированием и высвобождает функциональную молекулу. Однако скорость высвобождения лекарства определяется интенсивностью ионизации с учетом максимальной дозы радиации, которую может переносить облучаемый орган [72].

Quintana JM. и др. использовали биоортогональный подход для конъюгации MMAE и доксорубина с Cys-34 бычьего сывороточного альбумина или с антителами к рецептору эпидермального фактора роста (α EGFR mAb). При этом было предложено использовать линкеры, возбуждаемые ионизирующим излучением [49]. На рис. 14 представлены структуры малеимидных производных и конъюгата с альбумином.

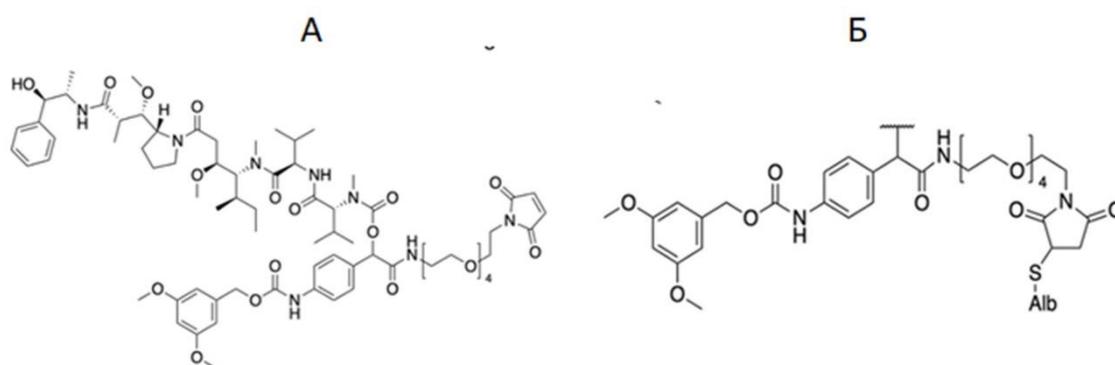


Рис. 14. А) Пролекарство, состоящее из 3,5-диметилоксибензилового спирта (DMBA) с саморазрушающимся линкером (SIL) и малеимидным якорем и MMAE; Б) Структура Alb-DMBA-SIL-MMAE [49]

Были синтезированы четыре конъюгата: Alb-DMBA-SIL-MMAE, Alb-DMBA-SIL-DOX, α EGFR mAb-DMBA-SIL-MMAE и α EGFR mAb-DMBA-SIL-DOX. Достигнутая степень модификации альбумина 0,12 молекулы MMAE, а в случае антитела - 5,6 молекулы MMAE.

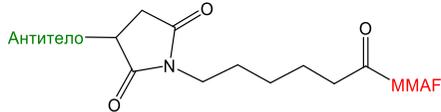
В условиях гипоксии опухолей рентгеновские лучи ионизируют молекулы воды в опухолевой ткани, образуя гидроксильные радикалы, которые активируют триггеры элиминирования диметоксибензилового спирта (DMBA) и высвобождают лекарственного средства. Эксперименты по тестированию способности расщепления линкера с облучением *in vitro* показали, что при дозе облучения 8–16 Гр может высвободиться 60–77% молекул лекарства. В экспериментах по цитотоксичности конъюгатов в отношении линии клеток анапластической карциномы щитовидной железы, плоскоклеточного рака полости рта, аденокарциномы толстой кишки и рака поджелудочной железы, которые обладают высокой устойчивостью к традиционной химиотерапии и лучевой терапии, было обнаружено, что

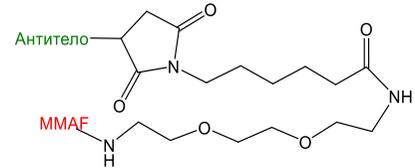
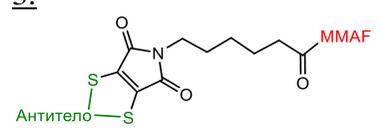
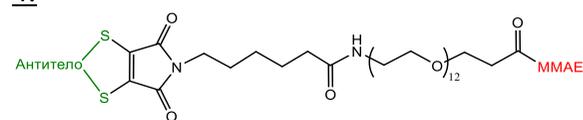
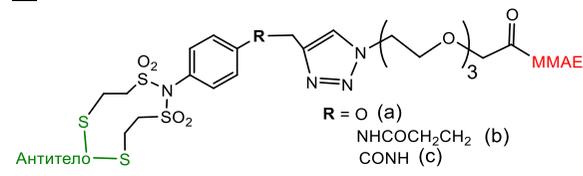
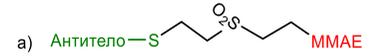
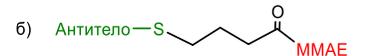
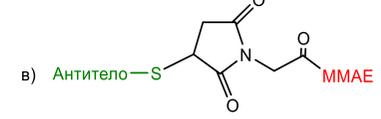
Alb-DMBA-SIL-MMAE обладает чрезвычайно низкой токсичностью в отсутствие радиации. Однако при облучении дозой 8 Гр он может высвободить $52 \pm 9\%$ MMAE и достичь такой же цитотоксичности, как и свободный MMAE. Это приводит к полному нарушению динамики микротрубочек раковых клеток. Конъюгаты mAb-DMBA-SIL-DOX и mAb-DMBA-SIL-MMAE подвергали такому же анализу *in vitro*, и полученные результаты были аналогичны. Этот новый метод конъюгации может значительно снизить системную токсичность лекарства, но для клинического применения используемая доза облучения 8-16 Гр считается относительно высокой [49].

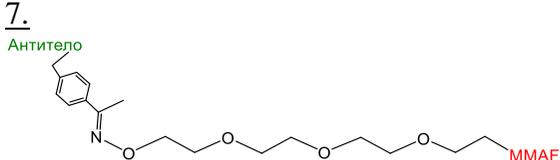
1.2.3. Нерасщепляемые линкеры

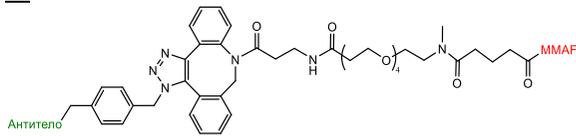
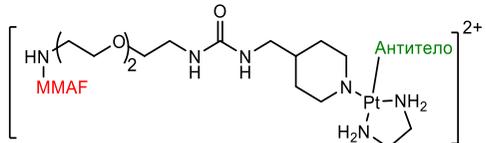
В случае терапевтических конъюгатов, содержащих нерасщепляемые линкеры, отсутствует проблема нестабильности конструкции в плазме крови. После фагоцитоза терапевтическая конструкция попадает в лизосому, и, под действием различных гидролитических ферментов, белок-носитель полностью разрушается, высвобождая полезную нагрузку и убивая клетки-мишени.

Таблица 2. Противоопухолевые конъюгаты ауристатинов с молекулами белка, созданные с использованием нерасщепляемых линкеров

Название	Структура	Белок	Соотношение препарата/антитело	Мишень	Статус исследования	Лит. Ист.
Депатуксизумаб мафодотин	<u>1.</u> 	Депатуксизумаб (IgG1 против EGFRvIII).	4	Глиобластома.	Клинические исследования фазы III, остановлено в 2019.	[21]
Белантам аб мафодотин Vlenrep®		Моноклональное афукозилированное антитело IgG1afuc против ВСМА.	4	Множественная миелома.	Одобрено в 2020.	[21]
h1F6-mcMMAF		Антитело h1F6 против CD70.	4/8	Глиобластома DBTRG05-MG, почечно-клеточный рак 786-O, Saki-1, UMRC-3.	<i>In vitro, in vivo</i> (мыши).	[73]
-		Гуманизированные моноклональные антитела IgG1каппа.	4	-	Исследование конформационных изменений.	[59]
Trastuzumab-Mal- AF	<u>2.</u>	Трастузумаб (антитело IgG1 против Her2).	2,5 – 2,7	Рак желудка с (NCI-N87) и рак молочной железы, (JIMT-1).	<i>In vitro, in vivo</i> (мыши).	[74]

						
TRA-DBM-MMAF и IGX-DBM-MMAF	3. 	Трастузумаб (антитело IgG1 против Her2) и новое антитело против CD98.	4	Карцинома молочной железы человека BT474, карцинома легких H446, опухоль яичника человека SKOV3.	<i>In vitro.</i>	[75]
NGM-MMAE-ADC	4. 	Трастузумаб (антитело IgG1 против Her2).	4	рак молочной железы SK-BR-3 и MCF-7.	<i>In vitro.</i>	[67]
-	5. 	Трастузумаб (антитело IgG1 против Her2), Цетуксимаб, (антитело против EGFR).	4	рак молочной железы SK-BR-3, MCF-7 и MDA-MB-468 рак легких HCC827.	<i>In vitro, in vivo</i> (мышь).	[76]
а) CC49-VS-MMAE б) CC49-Br-MMAE, в) CC49-mal-MMAE	6. а)  б)  в) 	Мышиное моноклональное антитело CC49 против TAG72.	а) 2,3 б) 10 в) 9,5	аденокарцинома яичника OVCAR3.	<i>In vitro, in vivo</i> (мышь).	[77]

ARX788	<p>7.</p> 	Трастузумаб (антитело IgG1 против Her2).	1,9	Рак молочной железы человека (SK-BR-3 RRID:CVCL_0033, HCC1954 RRID:CVCL_1259, BT-474 RRID:CVCL_0179, MDA-MB-453 RRID:CVCL_0418, RRID MDA-MB-175: CVCL_1400, RRID MCF-7: CVCL_0031, MDA-MB-231 RRID: CVCL_0062 и MDA-MB-468. RRID:CVCL_0419, RRID:CVCL_2077), рак легких (Calu-3 RRID:CVCL_0609), рак яичников (SKOV-3 RRID:CVCL_0532 и OVCAR-3 RRID:CVCL_0465); рак желудка (NCI-N87 RRID:CVCL_1603).	In vitro, in vivo (мыши)	[78]
		Трастузумаб (антитело IgG1 против Her2)	1,9	Солидные опухоли (опухоли со сверхэкспрессией HER2, включая рак молочной железы, желудка, толстой кишки, поджелудочной железы и яичников).	Доклинические исследования Фаза I.	[79][80]
10-MMAF	<p>8.</p> 	IgG1 против Her2. Модифицированное последовательностью Phe-Cys-Pro-Phe в C-	1	Рак молочной железы BT474	<i>In vitro.</i>	[81]

		концах тяжелых цепей				
Trastuzum ab HC136- MMAF	9. 	IgG1 против Her2. модифицирова нное параазидомети л-L- фенилalaniно м	1,2 – 1,9	Рак молочной железы SKBR3.	<i>In vitro.</i>	[82]
⁸⁹ Zr- trastuzuma b-Lx-AF	10. 	Трастузумаб (антитело IgG1 против Her2)	2,5 – 2,7	Рак желудка с (NCI-N87) и рак молочной железы, (JIMT-1).	<i>In vitro,</i> <i>in vivo</i> (мышь).	[74][83]

Нерасщепляемый линкер первого поколения состоит из малеимид-капроила привязанного к ауристатину и случайным образом конъюгирующего с белком-носителем за счет малеимидной группы (таблица 2, структура 1). Этот линкер был использован для создания таких ADC, проходящих клинические испытания, как *Депатуксизумаб мафодотин* и *Белантамаб мафотодин* [21][59][73].

Из-за отсутствия сосудистого распределения внутри опухолей препараты ADC, использующие антитела в качестве носителей, часто сталкиваются с проблемами малого проникновения в опухолевые ткани и гетерогенного распределения лекарств в организме [84]. Следовательно, использование более мелких таргетных носителей для улучшения распределения лекарственного средства внутри опухолей важно для повышения его эффективности *in vivo*.

Однодоменные антитела (нанотела) представляют собой фрагменты антител с меньшей молекулярной массой, не содержащие в своей последовательности остатков цистеина. К первичной последовательности такого однодоменного антитела можно добавить один (или несколько) цистеинов для достижения специфического связывания с молекулами лекарственного средства с использованием химии тиол-направленной конъюгации. Однако эта стратегия часто сталкивается с проблемами быстрого почечного клиренса и короткого времени циркуляции в организме, поскольку получаемые в рамках стратегии конструкции имеют массу меньше, чем пороговая молекулярная масса клубочкового фильтра почек.

Среди однодоменных антител возможно создание так называемых аффител. Аффитела к сывороточному альбумину человека обладают чрезвычайно высоким сродством к сывороточному альбумину человека и могут продлевать период полураспада нанотел *in vivo* [85].

Wen Y и др. совместили ауристатин, малеимидокапроильный линкер и аффитела в одной конструкции. Они присоединили радиоактивно меченную последовательность Met-His-Glu-His-Glu на N-конец белка, состоящего из фрагмента антитела, аффинного к Her2 (ZHER2:2891) и альбумин-связывающего домена (ABD). Затем гибридный белок-носитель использовали для конъюгации малеимидокапроильными производными ауристатинов mc-MMAE и mc-MMAF (рис. 15). Все полученные таким образом конъюгаты показали сильное сродство к альбумину. В экспериментах по токсичности *in vitro* на клетках рака яичников с высокой экспрессией HER2 и клетках рака легких со средней и низкой экспрессией HER2 было обнаружено, что ZHER2-ABD-mcMMAF является наиболее эффективной терапевтической конструкцией, чем ZHER2-ABD-mcMMAE.

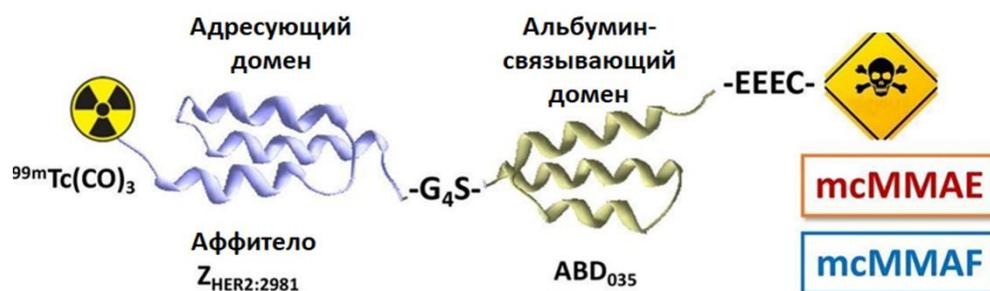


Рис.15. Структура терапевтических конструкций ZHER2-ABD-mcMMAF и ZHER2-ABD-mcMMAE [65].

В экспериментах *in vivo* на мышах с ксенотрансплантатами клеток рака яичников конструктор ZHER2-ABD-mcMMAF показал наибольшую эффективность. Он ингибировал рост опухоли и значительно продлевал выживаемость при полном ответе на лечение в 50%, при этом не наблюдалось никаких токсических поражений печени и почек. Хотя ZHER2-ABD-mcMMAE имел меньшую эффективность по сравнению с аналогом, содержащим MMAF, он демонстрировал более высокое накопление в опухолевой ткани, и, при этом, проявлял меньшую токсичность. Это связано с тем, что использование нерасщепляемого линкера, не является эффективным в случае MMAE [12]. Недостатком всех трёх терапевтических конструкций был значительный почечный клиренс. Это означает, что схемы лечения с использованием этих лекарств, по сравнению с препаратами, конъюгированными с иммуноглобулинами, требуют более высокой частоты приема и более высоких доз лекарств [65].

Albone E.F. и др. использовали PEG2 вместо гексановой кислоты для связывания MMAF с малеимидной функцией (таблица 2, структура 2). Такая конструкция специфически конъюгирует с двумя свободными тиоловыми группами химерного антитела кролика и человека [86].

Чтобы улучшить гомогенность при присоединении полезной нагрузки к антителу, *Behrens C. R. и др.* использовали диброммалеимид вместо малеимида (таблица 2, структура 3), достигаемая при этом степень модификации антитела была равна 4 [75]. *Nunes J.P.M. и др.* использовали тот же функциональный фрагмент для присоединения полезной нагрузки к антителу, но при этом они внедрили в состав линкера фрагмент PEG12. Это позволило авторам добиться повышения растворимости модифицированного линкером MMAE в воде (таблица 2, структура 4) [67]. Эти авторы также обнаружили, что гидролиз *in vitro* дитиомалеимидного конъюгата с антителом до тиол-стабилизированной малеаминовой кислоты может предотвратить диссоциацию по механизму обратной реакции Михаэля. Это может дополнительно улучшить стабильность ADC *in vivo*.

Huang R и др. [76] использовали фрагмент *N*-фенилдивинилсульфонамида в качестве связывающего звена с антителом (таблица 2, структура 5). Этот фрагмент был предварительно присоединен посредством реакции Хьюсгена с ММАЕ, функционализированным этиленгликолиевым мостиком с азидогруппой на конце. Авторы использовали три типа мостиков, находящихся между *N*-фенилдивинилсульфонамидом и тройной связью, подвергающейся циклоприсоединению по Хьюсгену. Как выяснилось, линкер, содержащий фрагмент (с) (таблица 2, структура 5) не обеспечивает достаточной устойчивости при хранении и достаточной гомогенности ADC при присоединении к цетуксимабу, хотя все синтезированные авторами ADC продемонстрировали хорошую эффективность в отношении HER2 и EGFR – положительных раковых клеток.

Minnix M. и др. разработали три типа линкеров для присоединения ММАЕ к антителу, направленному на гликопротеин TAG72 (таблица 2, структура 6): винилсульфон, бромацетамид и малеимид. Эти линкеры соединялись с восстановленной дисульфидной связью шарнирной области антитела давая степень модификации 2,3, 10 и 9,5 соответственно. Эксперименты *in vivo* и *in vitro* показали, что, период полураспада ADC, содержащего гидролизуемый малеимидный линкер, намного короче, чем в случае двух других, более стабильных линкеров. Кроме этого, ADC, образованное с помощью этого линкера, оказывало меньше влияния на скорость роста опухоли и выживаемость [77].

Skidmore L и др. использовали короткий и нерасщепляемый линкер гидроксилламин-ПЭГ4 для соединения *N*-конца ММАЕ и специфического аланинового сайта рекомбинантного антитела для создания гомогенного ADC со степенью модификации полезной нагрузкой, равной 2 (таблица 2, структура 7). Как было показано, этот линкер обеспечивает высокую стабильность препарата ADC в плазме крови, не влияя на активность рекомбинантного антитела *in vivo* [78].

Zhang C. и др. [81] разработали последовательность из четырех аминокислот (Phe-Cys-Pro-Phe), названную «π-зажим». Этот пептид может избирательно модифицировать перфторированную ароматику за счет имеющегося в его составе цистеина. Специфичность сайта модификации в этом случае опосредована возможностью образования стеккинг-взаимодействия перфторированной ароматики и ароматических аминокислот. Данная стратегия позволяет селективно модифицировать один остаток цистеина в белках, содержащих множество эндогенных остатков цистеина, тем самым обеспечивая сайт-селективную конъюгацию (таблица 2, структура 8). При этом, сайт-специфические конъюгаты антитело-лекарственное средство синтезируются без нарушения сродства антитела к мишени.

Для достижения хорошей гомогенности ADC, *Zimmerman E. S. и др.* предложили использовать не катализируемое медью азид-алкиновое циклоприсоединение с применением таких неприродных аминокислот, как *n*-азидо-L-фенилаланин или *n*-азидометил-L-фенилаланин и MMAE, несущего фрагмент дибензоциклооктана на нерасщепляемом линкере (таблица 2, структура 9). Авторы синтезировали трастузумаб, содержащий 4 молекулы полезной нагрузки. При этом, авторами была предложена платформа для ферментативного синтеза антител, несущих неприродные азид-содержащие аминокислоты. В целом, этот метод обеспечивает быстрое массовое производство однородных ADC [82].

Merkul E и др. предложили стратегию, основанную на высоком сродстве Pt (II) к *N* и *S*-электронодонорным соединениям, в том числе и белкам [74]. Они предложили использовать катионный металлоорганический линкер на основе Pt^{II} [этилендиамин платина(II)]²⁺ («Lx»[®]). В этой стратегии одна из связей Pt-Cl заменяется на *N*-гетероцикл, связанный с полезной нагрузкой (например, пиперидин), а вторая такая связь заменяется на взаимодействие Pt с остатками His, Met или Cys в составе белка (таблица 2, структура 10). Благодаря наличию положительно заряженного центра Pt (II) растворимость в воде линкерного фрагмента повышается по сравнению с аналогичными конструкциями без Lx. В присутствии тиомочевины удаётся добиться селективной конъюгации по остаткам гистидина на белке. Однако, в изначальном виде эта стратегия имела низкий выход конечного продукта конъюгации. Авторы улучшили выход реакции с помощью добавки иодида натрия, сделав анион I⁻ уходящей группой при замещении возле Pt (II) [87].

Из-за отсутствия сосудистого распределения внутри опухолей препараты ADC, использующие антитела в качестве носителей, часто сталкиваются с проблемами малого проникновения в опухолевые ткани и, как следствие, малого накопления в них [84]. Следовательно, использование более мелких таргетных носителей для улучшения распределения лекарственного средства внутри опухолей важно для повышения его эффективности *in vivo*.

Команды *Wen Y и Xenaki KT* [65][85], разработали в качестве носителя для ауристатинов гибридный белок, который содержит нанотело-аффибоды человеческого эпидермального фактора роста (Her2) и аффибоды к альбуминсвязывающему домену (ABD). С-конец носителя снабжен одним цистеином для селективного присоединения лекарств. После инъекции, благодаря сродству ABD к альбумину, слитый белок быстро связывается с сывороточным альбумином (рис.16). За счет этого продлевается период полувыведения и удаётся избежать клубочковой фильтрации.

Xenaki KT и др. генетически объединили нанотело 11A4, нацеленное на HER2, с альбумин-связывающим доменом (ABD), который содержит свободный цистеин на С-конце и структурный фрагмент, позволяющий избежать почечного клиренса. Они также разработали катионный металлоорганический линкер на основе Pt(II) (Lx) для замены малеимида при связывании гидрофобных молекул ауристатиона F (AF) с носителем. Два конъюгата с соотношениями лекарство : антитело, равными 1, 11A4-ABD-mal-AF и 11A4-ABD-Lx-AF, были синтезированы и протестированы на токсичность по отношению к опухолевым клеткам *in vivo* и *in vitro*.

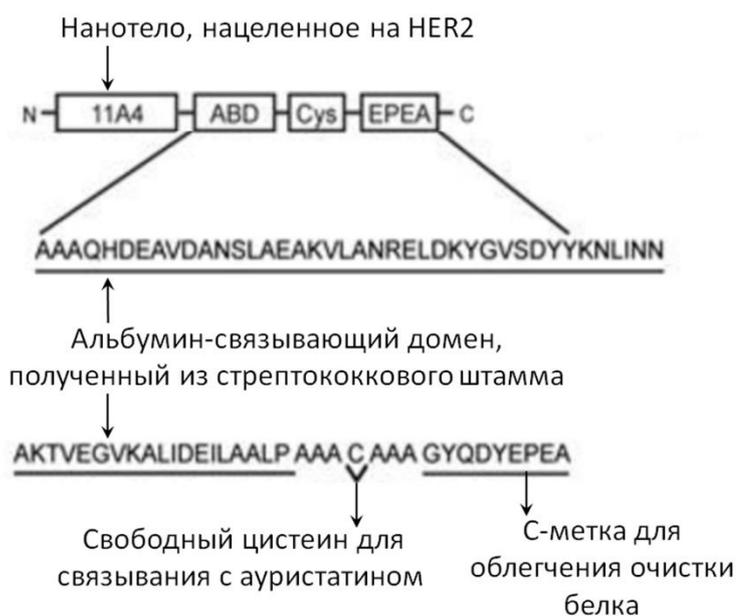


Рис. 16. Схематическое изображение конструкции 11A4-ABD нанотело [85].

В экспериментах *in vitro* оба конъюгата интернализовались клетками BT-474 и NCI-87, экспрессирующими HER2, демонстрируя специфическое связывание с мишенями в наномолярном диапазоне концентраций. В исследовании эффективности на HER2-положительных клетках рака желудка человека, трансплантированных мышам, эффективность, достигнутая после однократной внутривенной инъекции с дозой 250 нмоль/кг в случае 11A4-ABD-mal-AF или 11A4-ABD-Lx-AF была сопоставима. При этом у мышей наблюдалась стойкая ремиссия опухоли в течение 124 дней. В контрольной группе (конъюгаты, не содержащие ABD) возобновление роста опухоли наблюдалось с 10-го дня после лечения 11A4-mal-AF или 11A4-Lx-AF [85].

Использование нерасщепляемого линкера предъявляет более строгие требования к лекарственным средствам, гарантируя, что высвобождаемые производные лекарственного средства также будут обладать значительной цитотоксичностью. Из-за недостаточной клеточной проницаемости заряженных аминокислотных придатков ADC, содержащие

нерасщепляемые линкеры, обычно не могут оказывать эффект свидетеля, поэтому область применения ограничена, в основном для лечения рака крови или опухолей с высокой экспрессией антигена, и скорость высвобождения препарата относительно низкая.

1.3. Введение в метод бор-нейтронозахватной терапии.

Идея бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ) впервые возникла в 1936 году под авторством Гордона Лочера [88]. Основной принцип БНЗТ заключается в том, что пациенту вводят борсодержащий препарат, соединения бора который способен накапливаться в опухолевых клетках, а затем участок опухоли облучается пучком нейтронов. После захвата нейтрона ^{10}B он превращается в ^{11}B , а нестабильный ^{11}B быстро распадается. В результате реакции могут высвободиться α -частицы (^4He) и ядра ^7Li в возбужденном состоянии (6,3%, общая энергия 2,79 MeV) или ядра ^7Li в основном состоянии (93,7%, полная энергия 2,31 MeV). Гамма-фотон с энергией 0,48 MeV генерируется в процессе возвращения из возбужденного состояния в основное [89]. Полная реакция показана на рис. 17:

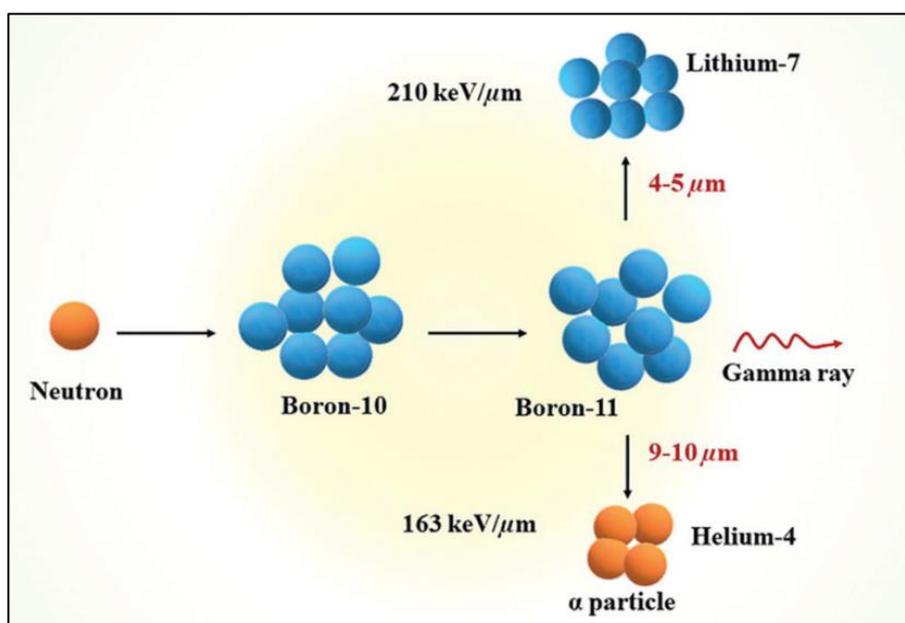


Рис. 17. Схема ядерной реакции при захвате нейтрона ядром ^{10}B [90].

Особенно метод БНЗТ важен в случае гипоксических раковых клеток, так как они обычно не чувствительны к рентгеновским, гамма- или электронным лучам, используемым в традиционной лучевой терапии [91].

Основным источником радиационного эффекта при БНЗТ являются альфа-частицы, обладающие высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ). Они проходят в ткани расстояние от 50 до 100 микрон, что соответствует диаметру клетки. Кроме этого происходит генерация активных форм кислорода. Все вместе приводит к непоправимым

двухцепочечным разрывам ДНК, и, как следствие, к остановке клеточного цикла с последующей митотической гибелью клеток, апоптозом или некрозом [92][93]. Поскольку сечение захвата нейтронов атомами бора много больше, чем у атомов, максимально представленных в организме (водорода, азота, углерода и фосфора), можно подобрать безопасную дозу облучения[90].

1.3.1. Проблема доставки бора в опухолевую ткань.

Борсодержащими агентами первого поколения были борная кислота, бура и пентаборат. Первое клиническое применение БНЗТ было осуществлено в 1951 году для лечения глиомы с использованием тетрабората натрия, не обладающего хорошей селективностью в отношении раковой ткани, в силу чего, не было достигнуто большого успеха и было много побочных эффектов[89][94]. Недостаточное накопление в опухолевых клетках делает эти агенты непригодными для использования в клинических условиях.

Второе поколение борсодержащих препаратов было представлено производными фенилаланина, такими 4-дигидроксидоборофенилаланин (БФА) и тиол-додекаборат натрия (BSH) (рис. 18).

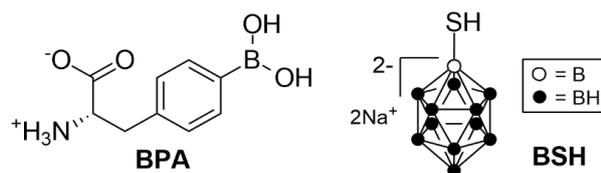


Рис. 18. Структура молекул борфенилаланина и боркаптата натрия.

Эти препараты обладают большей избирательностью, чем препараты первого поколения, и до сих пор применяются в клинических исследованиях и для лечения периферических опухолей, таких как такие как глиобластома, опухоли головы и шеи, меланома, рак легких, колоректальный рак и рак печени [95][96][97][98][99][100]. Например, препарат *Стеборонин*® (комбинация ВРА и D-сорбита) был одобрен в Японии в марте 2020 года для лечения рака головы и шеи. Однако, в случае применения этих терапевтических агентов и их аналогов существует ряд проблем, связанных, прежде всего с недостаточной селективностью накопления в опухоли, невозможностью поддержания высокой концентрации бора в опухоли во время нейтронного облучения после однократной инъекции [96][101].

Для достижения успешного лечения с помощью БНЗТ существует острая необходимость разработки и синтеза препаратов бора с достаточной селективностью к опухоли [102]. На грамм опухоли необходимо доставить примерно 20–50 мкг ^{10}B

(приблизительно 10^9 атомов/клетку). Соотношения концентрации опухоль/нормальная ткань (Т/Н) и опухоль/кровь (Т/В) должно быть выше чем 3:1. А также должны соблюдаться минимальная системная цитотоксичность и быстрый клиренс из крови и нормальных тканей; устойчивость препарата в физиологических условиях, низкая цитотоксичность без облучения.

Чтобы преодолеть недостатки ВРА и BSH, было предпринято несколько стратегий:

- 1) модификация бором низкомолекулярных соединений аминокислот [102][103][104][105].
- 2) модификация бором углеводов [106][107][108][109];
- 3) модификация бором нуклеиновых кислот [110][111][112][113];
- 4) модификация бором порфиринов и их аналогов [114][115][116][117][118][119];
- 5) модификация бором пептидов [120][121][122];
- 6) модификация бором липопептидов [123][124];
- 7) модификация бором наночастиц [125][126][127][128][129][130][131];
- 8) модификация бором липосом [132][133][134][135];
- 9) модификация бором белков [136][137][138][139][140][141][142][143][144][145][146][147][148].

Дальнейшая часть обзора будет посвящена описанию борсодержащих конструкций на основе белков.

1.3.2. Борированные моноклональные антитела

На поверхности раковых клеток находится большое количество антигенов. Благодаря механизму связывания со специфическими рецепторами моноклональные антитела широко используются для улучшения нацеливания лекарств на раковые клетки и снижения системной токсичности медикаментозного лечения. Продемонстрировано, что, при использовании в качестве агентов доставки бора, моноклональные антитела могут обеспечить высокое поглощение бора раковыми клетками [136][137].

Цетуксимаб представляет собой химерное моноклональное антитело IgG1, которое способно связывать эпидермальный фактор роста EGFR и, тем самым, замедлять рост опухоли блокируя рецептор для связывания с эндогенными лигандами. Клеточный макропиноцитоз, опосредованный EGFR может значительно увеличить возможность абсорбции бора. *Цетуксимаб* подходит в качестве носителя при создании терапевтических средств для БНЗТ при лечении метастатических видов рака, таких как колоректальный рак, рак легких,

рак головы и шеи. *Rondina A и др.* в своей работе разработали мутантные антитела на основе цетуксимаба, имеющие в своём составе фенолборную, *p*-толуолборную и циклопентилборную кислоты (рис.19). Компьютерное моделирование показало, что специфичность, а также структура и функции боросодержащих антител полностью сохраняются, таким образом, они обладают двойной противоопухолевой активностью, как химиотерапевтические препараты, и как непосредственные участники лучевой терапии [137].



Рис. 19. Борсодержащие фрагменты в составе цетуксимаба [137].

В рамках работы [136], авторами был использован пептид Z33, который может эффективно связываться с доменом Fc цетуксимаба. Этот пептид был модифицирован по остатку цистеина малеимидным производным BSH. Авторы показали, что конъюгат Z33 и BSH (Z33-DB) может легко образовывать с антителом комплекс, способный нацеливаться на целевой рецептор на мембране раковой клетки (рис. 20). Авторы предположили, что при этом может произойти активация рецептора EGFR и индукция макропиноцитоза. Тем самым может быть значительно увеличено эффективное поглощение комплекса Z33-DB-антитело. В результате, эксперименты БНЗТ *in vitro* продемонстрировали токсичность конструкции по отношению к эпидермальным раковым клеткам человека A431 [136].

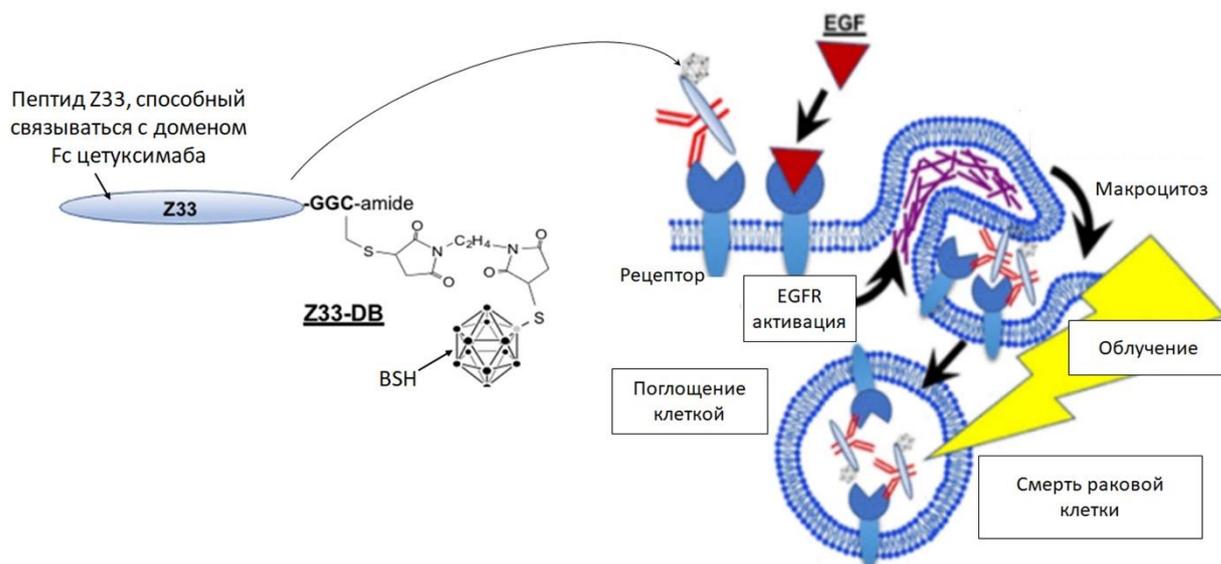


Рис. 20. EGF активирует EGFR-индуцированный клеточный макропиноцитоз, что приводит к эффективному клеточному поглощению конъюгатов Z33-DB [136].

Kuthala N и др. [138] создали наночастицы из фосфата бора ($^{10}\text{BPO}_4$), а затем модифицировали их поверхность полиакриловой кислотой и антителами к EGFR. В результате получились частицы анти-EGFR- $^{10}\text{BPO}_4$, обладающие улучшенной диспергируемостью в водной среде, высоким содержанием ^{10}B и способностью нацеливания на раковые клетки. Эксперименты *in vitro* в условиях нейтронного излучения показали, что наночастицы обладают в два раза более высокой эффективностью уничтожения раковых клеток, чем свободный ВРА. В экспериментах *in vivo* наблюдалось, что наночастицы накапливались в больших количествах в опухоли головы и шеи, при этом соотношение опухоль/кровь достигало 4,27. Кроме того, они обладали хорошей биосовместимостью. В экспериментах *in vivo* было достигнуто двухкратное увеличение выживаемости мышей, имеющих рак головы и шеи, обработанных анти-EGFR- $^{10}\text{BPO}_4$ частицами, по сравнению с таковыми, получавшими ВРА-Ф. Так же было показано уменьшение вероятности рецидива опухолей.

В целом, стратегия использования антител для создания БНЗТ препаратов является перспективной. Но сами антитела обладают и рядом недостатков: иммуногенность, большая стоимость, проблемы, связанные с хранением препаратов.

1.3.3. БНЗТ-препараты на основе альбумина

Человеческий сывороточный альбумин является наиболее распространенным переносчиком разнообразных веществ в плазме крови и обладает хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью и низкой иммуногенностью, устойчивостью при хранении в сухом виде и в растворах. Он широко применяется для создания конструкций, транспортирующих противораковые лекарства (паклитаксел, доксорубин, цисплатин, платина, гемцитабин, метотрексат, олапариб, дзатиниб и т. д.).

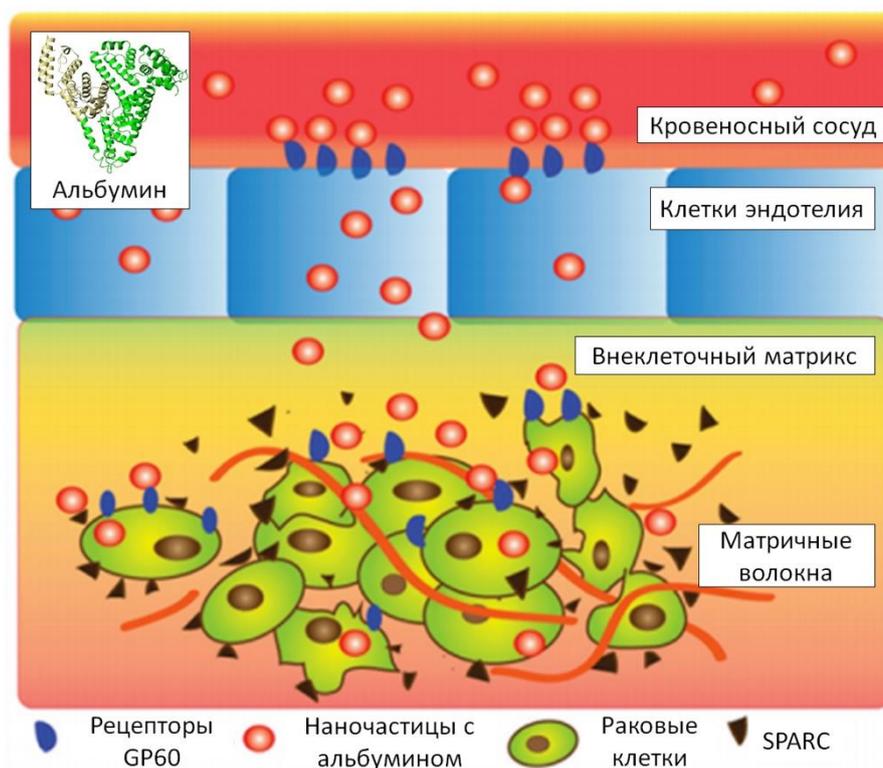
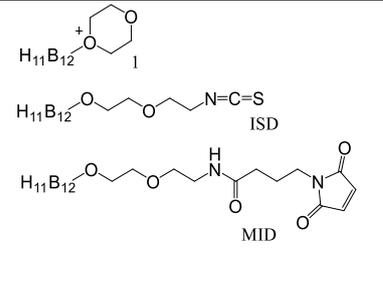
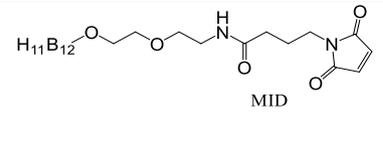
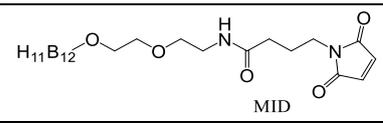
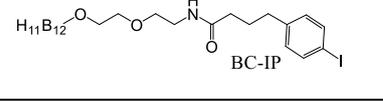
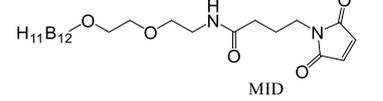
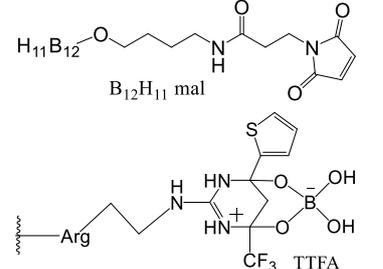


Рис. 21. 1) Взаимодействие наночастиц альбумина со SPARC и рецепторами gp 60 [139]. Вставка - структура человеческого сывороточного альбумина (PDB ID: 6M4R)

Длительное время циркуляции терапевтических конструкций на основе альбумина дает возможность для пассивного накопления препарата в злокачественных опухолях благодаря сосудистым дефектам солидных опухолей. Феномен, известный как эффект повышенной проницаемости и удерживания (накопления) (EPR-эффект) [140]. Кроме того накопление конъюгатов альбумина с лекарственным препаратом в опухолевых клетках может быть обусловлена транцитозом в интерстициальное пространство опухоли, который инициируется связыванием альбумина с албондином (gp60 рецептор) с последующим взаимодействием с другим вектором – рецептором SPARC (Secreted Protein Acid and Rich in Cysteine, кислый секретируемый белок, богатый цистеином) [139][141].

Таблица 3 Основные типы линкеров, предназначенные для связывания клозо-додекабората с альбумином.

Структура	Белок	Цель	Мишень	Доза (мг 10^6 /кг)	DAR*	Ссылка
<p>MID</p>	BSA	Воздействие на опухоль in vivo Связывание in situ	Рак толстой кишки	7,5 - 30	3	[142]

	BSA HSA	Изучение степени модификации разными препаратами Распределение малеимидной конструкции в организме мыши	Рак толстой кишки	30	-	[143]
	BSA	Воздействие на опухоль in vitro и in vivo	Глиома U87M G Рак лёгких	7,5	3.2	[144]
	BSA	Переносимость препарата мышами	Рак полости рта	30 15	3.2	[145]
	HSA	Распределение в организме мыши Связывание in situ	Глиома Рак лёгких	15	3,5	[146]
	HSA	Воздействие на опухоль in vitro и in vivo	Глиома F98	12	3.2	[147]
	HSA	Воздействие на опухоль in vitro	Глиома T98G	-	(B ₁₂ H ₁₁ mal) 2,8 (TTFA) 4,5	[148]

*DAR – степень модификации белка

Команда *Nakamura H.* синтезировала функционализированный малеимидом клозо-додекаборат (Таблица 1, структура MID), который может эффективно конъюгировать с альбумином через остаток цистеина. Однако, как показали авторы, при конъюгации могут так же быть задействованы и остатки лизина.

По сравнению с комплексами 1,4-диоксан-о-додекановой кислоты (Таблица 1, соединение 1) и изотиоцианат-функционализированными околододекановыми эфирами (Таблица 1, структура ISD), у MID самая высокая эффективность конъюгации с BSA [144],[143]. Конъюгат MID-BSA эффективно накапливался в опухолях колоректального рака у мышей, тогда как концентрация была ниже в печени, почках и селезенке [143]. При этом была задействована доза 30 мг[B]/кг. В работе [142] было показано, что в условиях нейтронного облучения конъюгат BSA-MID, получаемый in situ, вызывает значительное торможение роста колоректального рака уже при дозе 7,5 мг[B]/кг. Как выяснилось, эта

доза попадает в хорошо переносимый диапазон доз. В работе [145], где исследовалась переносимость препарата BSA-MID на мышинной модели, содержащей химически индуцированный рак полости рта, препарат вызывал очевидную токсичность при дозе 30 мг[B]/кг, а уже при дозе 15 мг[B]/кг препарат оказывал ингибирующее действие на рак полости рта и не имея очевидной токсичности. Было так же показано, что соотношение препарата опухоль/кровь остается ниже 1 через 12 часов. Авторы полагают, что инъекционная токсичность и высокие концентрации бора в крови связаны со злокачественностью опухоли и микроокружением различных опухолей и зависят от конкретной опухолевой модели.

Подобно взаимодействию BSA с MID, HSA и MID также имеют высокую скорость конъюгации. Эффективное накопление HSA-MID в опухоли было достигнуто у мышей с колоректальным раком (23 ppm – в опухоли при 3-8 ppm в печени и почках). Таким образом, HSA-MID так же является перспективным носителем бора для БНЗТ [143].

Чтобы снизить общую инъецируемую дозу препаратов альбумина с клозо-додекаборатом, была предложена стратегия конъюгации борсодержащих пролекарств с альбумином *in situ*. Кроме MID, связывающегося с альбумином *in situ* ковалентно [142], был предложен 4-иодфенилбутанамид BC-IP (Таблица 1), связывающийся с HSA нековалентно [146]. По сравнению с MID, препарат BC-IP имеет более сильное сродство к HSA (степень модификации достигает около 3,5). Без нейтронного облучения он обладает чрезвычайно низкой токсичностью для линий опухолевых клеток. Используя мышиную модель с глиобластомой человека U87MG и дозу 15 мкг[B]/г, авторы достигли более сильного накопления опухоли, по сравнению с MID (11 мкг[B]/г в опухоли через 3 часа после внутривенной инъекции) и более низкого накопления в крови, легких и почках (менее 5 мкг[B]/г).

Другой стратегией, нацеленной на улучшение накопления борсодержащих препаратов на основе альбумина в опухолях, в том числе в опухолях головного мозга, является модификация конструкции cRGD-пептидом, нацеленным на интегрин. Команда [144] синтезировала cRGD-MID-BSA. Флуоресцентная визуализация меченного Cy5 cRGD-MID-BSA *in vivo* показала, что cRGD усиливает опухолеспецифическое накопление и удержание конъюгата в моделях ксенотрансплантатов CT26 и U87MG вживленных мышам. После нейтронного облучения наблюдалось значительное торможение роста опухоли. Никаких неблагоприятных побочных эффектов не наблюдалось в течение как минимум 18 дней после БНЗТ.

Впоследствии, в другой работе этой же команды [147], была проведена конъюгация cRGD-MID с сывороточным альбумином человека (HSA) и изучен противоопухолевый эффект cRGD-MID-HSA на модели опухоли головного мозга крысы F98. Исследования *in vivo* показали, что cRGD-MID-HSA может проникать через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в опухолях головного мозга. Если сравнивать с таким золотым стандартом БНЗТ, как борфенилаланин, время удерживания этих препаратов оказалось больше, а концентрация в здоровой ткани головного мозга ниже. Это может уменьшить повреждение здоровой ткани головного мозга во время проведения БНЗТ. Так или иначе, наблюдалась длительная выживаемость у крыс после лечения БНЗТ с использованием cRGD-MID-HSA.

Но стоит упомянуть, что, как и другие конструкции с MID, конъюгат с cRGD имеют высокую концентрацию в крови [144]. Авторы полагают, что это можно объяснить перемещением конструкции из кровеносных сосудов через щель между эндотелиальными клетками и это не должно вызвать серьезных побочных эффектов. В отличие от препаратов на основе альбумина, низкомолекулярные препараты бора просачиваются из кровеносных сосудов через эндотелиальные клетки в здоровую ткань, поэтому, высокие концентрации бора в крови в случае использования низкомолекулярных препаратов могут вызвать серьезное повреждение кровеносных сосудов.

Ранее, наши коллеги [148] усовершенствовали метод связывания молекул борсодержащих производных с HSA (Таблица 1, структуры $B_{12}H_{11}mal$ и TTFA). Авторы модифицировали остатки лизина HSA тиолактоном гомоцистеина, который способен при раскрытии тиолактонового кольца за счет реакции ацилирования высвободить дополнительные тиоловые группы. Таким образом, Cys-34 белка может быть задействован под присоединение флуоресцентной метки, а дополнительные тиоловые группы – под присоединение малеимидных производных *клозо*-додекаборана. Кроме этого, наличие в структуре тиолактона гомоцистеина аминогруппы позволяет использование структурных аналогов тиолактона гомоцистеина, несущих различные метки. Так, авторами данной работы был использован *N*-трифторацетилгомоцистеин, содержащий атомы фтора, потенциально полезные для метода МРТ. Кроме того, по остаткам аргинина HSA был также введен теноилтрифторацетон (TTFA), и полученный конъюгат был обработан борной кислотой. Это еще больше увеличивает количество атомов бора в одной молекуле HSA. Согласно этой стратегии, авторам удалось ввести 2,8 остатков *клозо*-додекабората и, 4,5 TTFA на одну молекулу белка. Большее содержание бора может позволить снизить дозы препарата при инъекции. В исследованиях *in vitro* конструкция HSA-Cys5-Hcy $B_{12}H_{11}$ -TTFA

показала умеренную токсичность в отсутствие облучения и резкое увеличение токсичности после облучения эпитеральными нейтронами.

1.4. Заключение

Стратегии, разрабатываемые в настоящее время для адресной доставки ауристинина и различных соединений бора в опухолевые клетки, весьма разнообразны. В плане присоединения к антителам и альбумину наиболее очевидными модифицируемыми остатками белка являются остатки цистеинов. В силу этого, наиболее применяемой химической функцией является малеимид. Однако, как показывает практика, малеимидные конъюгаты не очень хороши, так как способны разрушаться, будучи еще в плазме крови. Таким образом, за последние несколько лет был создан целый арсенал более приемлемых способов присоединения к белкам. Стоит отметить, что в плане ауристинов этот арсенал много шире, чем в случае борированных молекул. Впрочем, было бы интересно и вполне реально использовать некоторые разработки, созданные для ауристинов для присоединения к белковым носителям кластеров бора. Учитывая разнообразие методов присоединения, возможно создание конструкции на основе альбумина или антитела, несущей обе эти полезные нагрузки. Такая стратегия будет выигрывать по сравнению с одновременным применением двух разных конструкций, одна из которых содержит ауристин, а вторая – атомы бора, так как у них может быть различная фармакокинетика и фармакодинамика, в следствие чего не получится добиться синэргического эффекта между полезными нагрузками. Однако до сих пор данных о таких работах нет.

РАЗДЕЛ 2. Экспериментная часть

2.1. Материалы и методы

2.1.1. Реактивы

Человеческий сывороточный альбумин (HSA) приобретён в Sigma–Aldrich Chem. Co. (Ст. Луис, США), номер продукта A3784.

Остальные реактивы так же были закуплены в Sigma-Aldrich (Великобритания), кроме тех, о которых сказано отдельно. Во всех экспериментах использовалась вода Milli-Q с проводимостью более 18 МΩ/см. Фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS) (10 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,3-7,5, Biolog). Пептиды MMAF и MMAE были предоставлены Suzhou Jianhua Pharmaceutical Co., Ltd (Суджоу, Китай). Сульфо-Су5 малеимид и Су7 малеимид были приобретены в ООО ЛюмипробРУС (Москва, Россия).

Органические растворители высушивали и очищали с помощью стандартных процедур.

Гомоцистеин тиолактон, содержащий *бис*(дикарболлид) комплекс кобальта, малеимидные аналоги гемцитабина, в том числе аналог, содержащий остаток *клозо*-додекабората были любезно предоставлены сотрудниками ЛОрС ИХБФМ СО РАН.

Конъюгаты mc-vc-pab-MMAE и mc-vc-pab-MMAF были предоставлены фармацевтической компанией Suzhou Jianhua Co., Ltd. (Сучжоу, Китай).

Клеточные линии MCF7, T98G и U87 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Российский филиал ЭТКС, Санкт-Петербург, Россия). Клетки MCF7 и T98G культивировали в питательной среде IMDM и DMEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), пенициллина (100 000 МЕ/л), стрептомицина (100 000 МЕ/л) и амфотерицина В (1 мг/л) во влажной атмосфере, содержащий 5% CO₂ при 37 °С. Клетки U87 культивировали при 37 °С в 5% CO₂ в среде α-MEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 1 мМ пирувата натрия, 50 ед/мл пенициллина и 100 г/мл стрептомицина.

2.1.2. Физико-химические методы

Электронные спектры поглощения были получены на спектрометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Концентрации растворов альбумина определяли методом поглощения при 278 нм, рН = 7,4, используя молярный коэффициент экстинкции в PBS $\varepsilon = 3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [149]. Концентрации растворов конъюгатов альбумина, содержащих флуоресцентный краситель Cy5, определяли методом поглощения при 646 нм, рН = 7,4, используя молярный коэффициент экстинкции $\varepsilon = 2,71 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрации растворов конъюгатов альбумина, содержащих флуоресцентный краситель Cy7, определяли методом поглощения при 762 нм, рН = 7,4, используя молярный коэффициент экстинкции $\varepsilon = 1,99 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Спектры поглощения растворов регистрировались в кварцевых кюветах с длиной пути 0,1 см.

Спектры ЯМР регистрировали при 25°C в 5-мм ЯМР-ампулах. Химические сдвиги (δ) представлены в частях на миллион (м.д.), а константы связи (J) - в Герцах (Гц). ^{13}C ЯМР спектр регистрировали на спектрометре DRX-500 (Bruker, Германия, рабочая частота 300,1 МГц). Химические сдвиги в спектре ^{13}C ЯМР оценены относительно ацетонитрила 1,94 м.д., 1.32 м.д. ^1H ЯМР спектр регистрировали на спектрометре AV-400 (Bruker, Германия, рабочая частота 400,1 МГц), сигналы оценивали относительно ДМСО 2,5 м.д. ^{19}F ЯМР спектры регистрировали на спектрометре AV-300 (Bruker, Германия, рабочая частота 282,4 МГц). В качестве внешнего эталона для химических сдвигов использовался C_6F_6 (δ 0,00 м.д.). Кратность каждого сигнала обозначается как с-синглет. Кратность каждого сигнала обозначена как: с – синглет, д – дублет, дд – дублет дублетов, т – триплет, к – квадруплет, м – мультиплет.

MALDI TOF масс-спектры белков регистрировали на масс-спектрометре Bruker Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия) MALDI-TOF в положительном линейном режиме. В качестве матрицы была использована 2,5-дигидроксибензойная кислота. Образцы белка обессоливали наконечниками ZipTip C4. Образцы пептидов MMAF и MMAE, растворённые в тетрагидрофуране, обессоливали наконечниками ZipTip C18. Масс-спектры были получены путем усреднения 3000 лазерных снимков. Внешняя калибровка обеспечивалась с помощью HSA (m/z 66500 Да, $[\text{M} + \text{H}]^+$).

Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэммли [150]. Концентрирующий гель: 5 % АА, 0,13 М трис-НСl (рН 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % PSA, 0,1 % TEMED. Разделяющий гель: 7,5 % АА, 375 мМ трис-НСl (рН 8,8), 0,1 % SDS, 0,1 % PSA,

0,08% TEMED. Препараты белка смешивали с равным объемом буфера (50 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 10 % SDS, 10 % глицерин, 0,025% бромфеноловый синий) и наносили на гель. Препараты белка смешивали с равным объемом лоадинг буфера, содержащего ДДТ (50 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 10 % SDS, 10 % глицерин, 0,025% бромфеноловый синий, 10 мМ ДТТ) и наносили на гель. Инкубирование препаратов с ДДТ проводилось при 90-95 °С в течение 5 мин и наносили на гель. Электрофорез проводили в течение 3 ч при 25 °С в буфере, содержащем 25 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 0.1% SDS, 250 мМ глицин, при 40-80 В в концентрирующем геле и 80-110 В в разделяющем геле. Положение белковых зон определяли по окраске геля 0.1% СВВ G-250 (кумасси бриллиантовый синий).

Тонкослойную хроматографию выполняли на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия). В качестве элюента использовали CH_2Cl_2 . Положение на пластинах соединений, содержащих аминокислоты, детектировали по образованию окрашенных пятен при реакции с нингидрином (0,1% раствор в смеси этанол/ледяная уксусная кислота 4:1 (v/v)) при нагревании, а так же использовали иодную камеру.

Очистку белковых конъюгатов проводили с помощью ультрафильтрационных центрифуг Millipore объемом 0,5 мл (Amicon Centriprep YM 30, Millipore, Bedford, MA), пропускающих молекулы с молекулярной массой менее 3000 Да. Очистку проводили двадцатикратным центрифугированием при 9000 оборотов в минуту: десять раз центрифугирование проводилось с промывкой продукта 10% раствором ДМСО в PBS, и, далее, 10 раз - с промывкой PBS.

Исследование цитотоксичности модифицированных образцов белка в отношении клеточных линий MCF7, T98G и U87 было проведено Захаровой О.Д. (ИХБФМ СО РАН) с помощью МТТ-теста [151]. Клетки выращивали до фазы экспоненциального роста и затем высевали в 96-луночные планшеты. Концентрация клеток составляла 2000 клеток на лунку. Перед обработкой клетки инкубировали в течение 72 часов. После этого их обрабатывали средой, содержащей альбумин и его конъюгаты. Концентрации конъюгатов находились в диапазоне от 0,02 до 60 мкМ по содержанию белка. Обработку проводили при 37°С в течение 72 часов. После этого добавляли МТТ до концентрации 0,5 мг/мл. После инкубации при 37°С в течение 2 ч среду удаляли и в каждую лунку добавляли по 100 мкл изопропанола для растворения кристаллов формазана. Планшет анализировали с использованием микропланшетного ридера Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific Corporation) с пиком поглощения при 570 нм. В качестве базовой линии использовали интенсивность

поглощения при 620 нм. Для каждого образца белка было проведено три независимых теста. Данные представлены как средние значения со стандартными отклонениями.

2.1.3. Синтетические методики

2.1.3.1. Синтез флуоресцентно меченного альбумина

Синтез был проведен согласно методике [152]. Раствор HSA (66,5 мг) в буфере PBS (1 мл, 1 мМ, 1 мкмоль) смешали с сульфо-Су5 малеимидом или Су7 малеимидом, растворённым в ДМСО (20 мкл, 0,5 мкмоль). При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 50:1. Реакция проводилась в течение 18 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученные белковые конъюгаты HSA-Су5 или HSA-Су7 были очищены от низкомолекулярных примесей (молекулярной массой менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centrifrep YM30, Millipore, Белфорд), как описано выше. Выход **HSA-Су5** ~75%. Электронный спектр поглощения: λ_{\max} 278 нм ($\varepsilon = (3.70 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\varepsilon = (6.80 \pm 0.1) \times 10^4$). Согласно методу электронной спектроскопии, степень модификации белка 25%. Масс спектрометрия (MALDI-TOF) m/z : измеренные значения MW для образца HSA-Су5 66500 (соответствует исходному HSA) и 67266 Да (соответствует присоединению одной молекулы сульфо-Су5 к HSA, рассчитанное значение MW для сульфо-Су5 766 Да). Выход **HSA-Су7** ~90,25%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\varepsilon = (3.7 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\varepsilon = (8.3 \pm 0.1) \times 10^4$). Согласно методу электронной спектроскопии, степень модификации белка 42%. Масс спектрометрия (MALDI-TOF) m/z : измеренные значения MW для образца HSA-Су5 66500 (соответствует исходному HSA) и 67171 Да (соответствует присоединению одной молекулы Су7 к HSA, рассчитанное значение MW для Су7 671 Да).

2.1.3.2. Синтез HSA-Су5-MMAF

HSA-Су5 в PBS (1,429 мл, 0,7 мМ, 1 мкмоль) был смешан с 6,15 кратным избытком пептида MMAF (286 мкл, 6.15 мкмоль) растворённым в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 5:1. Реакция проводилась в течение 18 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Су5-MMAF был очищен от низкомолекулярных примесей (молекулярной массой менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centrifrep YM30, Millipore, Белфорд), как описано ранее. Выход **HSA-Су5-MMAF** ~90%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\varepsilon = (5.25 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\varepsilon = (6.80 \pm 0.1) \times$

10⁴). MALDI-TOF m/z : расчётное значение MW для HSA-Cy5-MMAF 68596 Да (в него включены измеренное значение MW для HSA: 66500 Да и расчётные значения MW для остатка сульфо-Cy5: 766 Да, и MMAF: 1330 Да). Измеренное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc составило 73916 Да, что соответствует 5 остаткам MMAF присоединенным к молекуле HSA-Cy5.

2.1.3.3. Синтез конъюгатов альбумина с трифторацелированным гомоцистеином и полезной нагрузкой (ауристатины MMAF и MMAE, гемцитабин, модифицированный клозо-додекабораном)

Синтез трифторацетата тиолактона гомоцистеина (HTLTFAc)

К суспензии гидрохлорида DL-тиолактона гомоцистеина (DL-HTL-HCl) (154 мг, 1 ммоль) в сухом CH₃CN (7 мл) добавляли диизопропилэтиламин DIPEA (126 мкл, 1,09 ммоль) После растворения добавили ангидрид трифторуксусной кислоты (ТФАн) (1,4 мл, 10 ммоль) тремя порциями, и при смешивании, используя охлаждение льдом. Смешивали реагенты при охлаждении льдом. Реакцию проводили в течение 1 ч. За реакцией следили с помощью ТСХ (элюент CH₂Cl₂). Далее реакционную смесь концентрировали в вакууме, продукт реакции экстрагировали 4 раза в органическую фазу в системе диэтиловый эфир / вода (2 мл / 2 мл). Растворитель из органической фазы удаляли в вакууме с получением желтоватого маслянистого остатка. Маслянистый остаток промыли толуолом и высушили до твердого вещества белого цвета. Выход **HTLTFAc** составил 30,6%. ТСХ (CH₂Cl₂): R_f = 0,38. ¹H ЯМР (DMCO-D₆, δ м.д., J в Гц): 8,72 (с, 1H, 5-H), 4,78 (м, 1H, 2-H), 3,55 (м, 1H, 4α-H), 3,36 (м, 1H, 4β-H), 2,70 (м, 1H, 3α-H), 2,38 (м, 2H, 3β-H). ¹³C ЯМР (CD₃CN, δ м.д.): 203,64 (с, 1-C); 159,78 (кв, J = 33,5 Гц, 6-C); 118 (м, J = 33,5 Гц, J = 290,8 Гц, 7-C); 69,57 (с, 2-C); 43,19 (с, 4-C); 30,34 (с, 3-C). ¹⁹F ЯМР (CD₃CN, δ м.д.): 87,89 (с, 3F, CF₃).

Синтез HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF

Синтез HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF был проведен по двум различным стратегиям.

Метод 1

HSA-Cy5 в PBS (1,2 мл, 0,84 мМ, 1 мкмоль) был смешан с 6,5-кратным избытком (1,38 мг, 60 мкл, 6,5 мкмоль) HTLTFAc растворённым в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 20:1. Реакция проводилась в течение 42 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый

конъюгат HSA-Cy5-HcyTFAc был очищен от низкомолекулярных примесей (молекулярной массой менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Белфорд), как описано ранее. Выход **HSA-Cy5-HcyTFAc** ~55%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\epsilon = (4.03 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\epsilon = (6.80 \pm 0.1) \times 10^4$). ^{19}F ЯМР (PBS +D₂O, δ , м.д.): 87.80 (с, CF₃). MALDI-TOF m/z: расчётное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc 67480 Да (в него включены измеренное значение MW для HSA: 66500 Да и расчётные значения MW для остатка сульфо-Cy5: 766 Да и для HcyTFAc 214 Да). Измеренное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc составило 67800 Да, что соответствует, в среднем, 2,5 остаткам HcyTFAc присоединенным к молекуле HSA-Cy5.

HSA-Cy5-HcyTFAc в PBS (740 мкл, 0,7 мМ, 0,518 мкмоль) был смешан с 3,2 кратным избытком пептида MMAF (2,2 мг, 74 мкл, 1,65 мкмоль) растворённым в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 10:1. Реакция проводилась в течение 18 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF был очищен от низкомолекулярных примесей (масса менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Белфорд), как описано ранее. Выход **HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF** ~92%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\epsilon = (4.7 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\epsilon = (6.80 \pm 0.1) \times 10^4$). ^{19}F ЯМР (PBS +D₂O, δ , м.д.): 87.90 (с, CF₃). MALDI-TOF m/z: расчётное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF 69131 Да (в него включены измеренное значение MW для HSA: 66500 Да и расчётные значения MW для остатка Cy5: 766 Да, для 2,5 остатков HcyTFAc: 535 Да и для MMAF: 1330 Да). Измеренное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF составило 69135 Да, что соответствует 1 MMAF присоединенным к полученной на предыдущей стадии молекуле HSA-Cy5-HcyTFAc.

Метод 2

HSA-Cy5 в PBS (1,510 мл, 0,84 мМ, 1,27 мкмоль) был смешан с 10-кратным избытком (2,64 мг, 75,5 мкл, 12,7 мкмоль) HTLTFAc растворённым в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 20:1. Реакция проводилась в течение 42 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Cy5-HcyTFAc был очищен от низкомолекулярных примесей (масса менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centriprep YM30, Выход **HSA-Cy5-HcyTFAc** ~55%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\epsilon = (4.7 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\epsilon = (6.80 \pm 0.1) \times 10^4$). ^{19}F ЯМР (PBS +D₂O, δ , м.д.): 87.80 (с, CF₃). MALDI-TOF m/z:

расчётное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc 67480 Да (в него включены измеренное значение MW для HSA: 66500 Да и расчётные значения MW для остатка Cy5: 766 Да и для HcyTFAc 214 Да). Измеренное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc составило 68122 Да, что соответствует 4 остаткам HcyTFAc присоединенным к молекуле HSA-Cy5.

HSA-Cy5-HcyTFAc в PBS (882 мкл, 0,7 мМ, 0,617 мкмоль) был смешан с 6,15 кратным избытком пептида MMAF (5 мг, 176,4 мкл, 3,78 мкмоль) растворённым в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 5:1. Реакция проводилась в течение 18 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Cy5-HTLTFAc-MMAF был очищен от низкомолекулярных примесей (молекулярной массой менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Белфорд), как описано ранее. Выход **HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF** ~92%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7.4): λ_{\max} 278 нм ($\varepsilon = (5.2 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\varepsilon = (6.80 \pm 0.1) \times 10^4$). ^{19}F ЯМР (PBS +D₂O, δ , м.д.): 87.70 (с, CF₃). MALDI-TOF m/z: расчётное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF 69452 Да (в него включены измеренное значение MW для HSA: 66500 Да и расчётные значения MW для остатка Cy5: 766 Да, 4 остатков HcyTFAc: 856 Да и для MMAF: 1330 Да). Измеренное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF составило 71449 Да, что соответствует 2,5 MMAF присоединенным к молекуле HSA-Cy5-HcyTFAc.

Синтез HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE

HSA-Cy5-HcyTFAc, полученный по методу 2, растворенный в PBS (1,43 мл, 0,7 мМ, 1 мкмоль) был смешан с 6,15 кратным избытком пептида MMAE (8,1 мг, 286 мкл, 6,15 мкмоль) растворённым в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 5:1. Реакция проводилась в течение 18 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE был очищен от низкомолекулярных примесей (масса менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Белфорд), как описано ранее. Выход **HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE** ~82,92%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7.4): λ_{\max} 278 нм ($\varepsilon = (5.4 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\varepsilon = (6.80 \pm 0.1) \times 10^4$). ^{19}F ЯМР (PBS +D₂O, δ , м.д.): 87.75 (с, CF₃). MALDI-TOF m/z: расчётное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE 68796 Да (в него включены измеренное значение MW для HSA: 66500 Да и расчётные значения MW для остатка Cy5: 766 Да, HcyTFAc: 214 Да и для MMAE: 1316,6 Да). Измеренное значение MW для HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE составило 72730 Да, что соответствует 3,5 MMAE присоединенным к молекуле HSA-Cy5-HcyTFAc.

Синтез HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAF

Синтез HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAF был проведен согласно описанному выше методу 2 для HSA-Cy5-НсуТFAc-MMAF

А именно: HSA-Cy7 в PBS (1,2 мл, 0,84 мМ, 1 мкмоль) был смешан с 10-кратным избытком (2,13 мг, 60 мкл, 10 мкмоль) НTLТFAc растворённым в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 20:1. Реакция проводилась в течение 42 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Cy7-НсуТFAc был очищен от низкомолекулярных примесей (масса менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centrifrep YM30, Millipore, Белфорд), как описано ранее. Выход **HSA-Cy7-НсуТFAc** ~83.75%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\epsilon = (4.7 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\epsilon = (8.3 \pm 0.1) \times 10^4$). MALDI-tof m/z: расчётное значение MW для HSA-Cy7-НсуТFAc: 67385 Да (в него включены измеренное значение MW для HSA: 66500 Да и расчётное значение MW для остатка Cy7: 671 Да, и расчётное значение MW для остатка НсуТFAc: 214 Да). Измеренное значение MW для HSA-Cy7-НсуТFAc составило 68027 Да, что соответствует, в среднем, присоединению 4 остатков НсуТFAc к молекуле HSA-Cy7.

Далее, HSA-Cy7-НсуТFAc в PBS (1,214 мл, 0,7 мМ, 0,85 мкмоль) был смешан с 6,15 кратным избытком пептида MMAF (6,96 мг, 121,4 мкл, 5,23 мкмоль) растворённым в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 10:1. Реакция проводилась в течение 18 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAF был очищен от низкомолекулярных примесей (масса менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centrifrep YM30, Millipore, Белфорд), как описано ранее. Выход **HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAF** ~66.4%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\epsilon = (5.7 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\epsilon = (8.3 \pm 0.1) \times 10^4$). MALDI-tof m/z: расчётное значение MW для HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAF: 69357 Да (в него включены измеренное значение MW для HSA: 66500 Да, расчётное значение MW для остатка Cy7: 671 Да, расчётное значение MW для 4 остатков НсуТFAc: 856 Да и расчётное значение MW для остатка MMAF: 1330 Да). Измеренное значение MW для HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAF составило 72416 Да, что соответствует присоединению, в среднем, 3,3 остатка MMAF к молекуле HSA-Cy7-НсуТFAc.

Синтез HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAE

HSA-Cy7-НсуТFAc, синтезированный аналогично способу, описанному в случае конъюгата HSA-Cy7-НсуТFAc-ММАЕ, растворенный в PBS (1,214 мл, 0,7 мМ, 0,85 мкмоль) был смешан с 6,15 кратным избытком пептида ММАЕ (6,83 мг, 121,4 мкл, 5,23 мкмоль) растворенным в ДМСО. При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 10:1. Реакция проводилась в течение 18 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Cy7-НсуТFAc-ММАЕ был очищен от низкомолекулярных примесей (масса менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Белфорд), как описано ранее. Выход **HSA-Cy7-НсуТFAc-ММАЕ** ~79,85%. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\varepsilon = (5.0 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 650 нм ($\varepsilon = (8.3 \pm 0.1) \times 10^4$). MALDI-tof m/z: расчётное значение *MW* для HSA-Cy7-НсуТFAc-ММАЕ: 69343,6 Да (в него включены измеренное значение *MW* для HSA: 66500 Да, расчётное значение *MW* для остатка Cy7: 671 Да, расчётное значение 4 *MW* для остатка НсуТFAc: 856 Да и расчётное значение *MW* для остатка ММАЕ: 1316 Да). Измеренное значение *MW* для HSA-Cy7-НсуТFAc-ММАЕ составило 70659 Да, что соответствует присоединению 2 остатка ММАЕ к молекуле HSA-Cy7-НсуТFAc.

Синтез HSA-Cy5-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁ и HSA-Cy7-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁

Очищенный HSA-Cy5-НсуТFAc или HSA-Cy7-НсуТFAc, синтезированные согласно методу 1, в буфере PBS (767 мкл, $0,7 \times 10^{-3}$ М) смешивали с малеимидным аналогом гемцитабина, несущим *клозо*-додекаборат на азотистом основании, растворенным в ДМСО, (соединение mal-GCB₁₁H₁₂, 2,72 мг, 45 мкл и 2,4 мкмоль). Используемый избыток mal-GCB₁₁H₁₂ относительно белка 4,5, соотношение объемов PBS/ДМСО 17,2. Реакцию проводили в течение 18 часов при 37°C. Очистку конечного конъюгата проводили с использованием центриконов (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Bedford, MA), как описано ранее. Выход **HSA-Cy5-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁** составил ~64%. Электронный спектр поглощения (буфер PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\varepsilon = (5,1 \pm 0,1) \times 10^4$), λ_{\max} 646 нм ($\varepsilon = (6,8 \pm 0,1) \times 10^4$). ЯМР ¹⁹F (буфер PBS, pH 7,4, D₂O до 20% от общего объема) 88,0 (*N*-трифторацетильный остаток). Масс-спектрометрия (MALDI-TOF) m/z: измеренная молекулярная масса HSA составляет 66500 Да. расчетная молекулярная масса HSA-Cy5-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁ составляет 68724 Да (*MW* HSA + *MW* Cy5 + 2,5 *MW* НсуТFAc + *MW* GCB₁₂H₁₁). Измеренная молекулярная масса HSA-Cy5-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁ составляет 69180 Да, что соответствует 1,5 присоединению остатков GCB₁₂H₁₁ на одну молекулу альбумина. Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой: 0,547 мг [¹⁰B]/литр

при концентрации образца 0,003 мкмоль/мл, что соответствует 1,5 остатка GCB₁₂H₁₁ на альбумин. Выход **HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁** составил ~60%. Электронный спектр поглощения (буфер PBS, pH 7,4): λ_{\max} 278 нм ($\varepsilon = (7,2 \pm 0,1) \times 10^4$), λ_{\max} 762 нм ($\varepsilon = (8,0 \pm 0,1) \times 10^4$). ЯМР ¹⁹F (буфер PBS, pH 7,4, D₂O до 20% от общего объема) 88,0 (N-трифторацетильный остаток). Масс-спектрометрия (MALDI-TOF) m/z: измеренная молекулярная масса HSA составляет 66500 Да. Расчетная молекулярная масса HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁ составляет 68630 Да (MW HSA + MW Cy7 + 2,5 MW HcyTFAc + MW GCB₁₂H₁₁). Измеренная молекулярная масса HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁ составляет 69095 Да, что соответствует присоединению 1,5 остатков GCB₁₂H₁₁ на одну молекулу альбумина. Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой: 0,97 мг [¹⁰B]/литр при концентрации образца 0,005 мкмоль/мл, что соответствует 1,5 остатка GCB₁₂H₁₁ на альбумин.

2.1.3.4. Синтез конъюгатов альбумина с бис-карболидным аналогом гомоцистеина и полезной нагрузкой (ауристатинны MMAF и MMAE, гемцитабин, модифицированный клозо-додекабораном)

Синтез HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂

HSA-Cy5 в PBS (2,235 мл, $8,4 \times 10^{-4}$ М, 1,88 мкмоль) был смешан с 6,5-кратным избытком Co(B₉C₂H₁₁)₂-HTL растворённым в ДМСО (7,895 мг, 118 мкл, 12,2 мкмоль). При этом соотношение PBS и ДМСО в реакционной смеси было 20:1. Реакция проводилась в течение 42 ч при 37°C, при аккуратном перемешивании, в защищённых от света условиях. Полученный белковый конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ был очищен от низкомолекулярных примесей (молекулярной массой менее 3000 Да) с использованием фильтров (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Белфорд), как описано выше. Выход **HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂** ~ 66%. Электронная спектроскопия (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 268 нм ($\varepsilon = (10,45 \pm 0,1) \times 10^4$), λ_{\max} 313 нм ($\varepsilon = (8,22 \pm 0,2) \times 10^4$), λ_{\max} 652 нм ($\varepsilon = (6,64 \pm 0,1) \times 10^4$). Масс спектрометрия (MALDI-TOF) m/z: измеренное среднее значение M для HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ 67982 Да соответствует присоединению двух остатков HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ на одну молекулу HSA (рассчитанное значение M для HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ 647 Да). Эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой: $1,99 \pm 0,08$ м.д. бора найдено при количестве исследуемого образца 0,035 мкмоль, что соответствует $2,01 \pm 0,05$ остатков HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ на молекулу альбумина.

Синтез HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF, -MMAE, и -GCB₁₂H₁₁

Очищенный конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂, растворенный в PBS (0,524 мл, 0,7 мМ, 0,367 мкмоль) смешивали с ДМСО растворами mc-vc-MMAF, mc-vc-MMAF, или mal-GCB₁₂H₁₁ (52,4 мкл, 2,8 мкмоль, массы 3,623 мг, 3,662 мг, 3,1 мг, соответственно). Молярное соотношение модифицирующий малеимидный компонент / конъюгат в реакционной смеси в каждом из трех случаев составляло 7,5, и объемное соотношение ДМСО / PBS было равно 0,1. Реакционные смеси аккуратно перемешивали течение 18 ч при 37°C. Выделение итоговых конъюгатов проводилось с помощью ультрафильтрационных пробирок Millipore, как описано выше. Выход **HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF** ~ 84,8%. Электронная спектроскопия (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 255 нм ($\varepsilon = (16.25 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 313 нм ($\varepsilon = (8.22 \pm 0.2) \times 10^4$) λ_{\max} 654 нм ($\varepsilon = (6.64 \pm 0.1) \times 10^4$). Масс-спектрометрия (MALDI-TOF) *m/z*: среднее измеренное значение *M* для HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF 70643 Да соответствует присоединению двух остатков MMAF на одну молекулу HSA (рассчитанное значение *M* для HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ 647 Да, рассчитанное значение *M* для mc-vc-pub-MMAF 1330 Да). Выход **HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE** ~ 86,77%. Электронная спектроскопия (PBS, pH 7,4): λ_{\max} 255 нм ($\varepsilon = (15.0 \pm 0.1) \times 10^4$), λ_{\max} 313 нм ($\varepsilon = (8.22 \pm 0.2) \times 10^4$), λ_{\max} 654 нм ($\varepsilon = (6.64 \pm 0.1) \times 10^4$). Масс спектрометрия (MALDI-TOF) *m/z*: среднее измеренное значение *M* для HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE 70615 Да соответствует присоединению двух остатков MMAE на одну молекулу белка (рассчитанное *M* для HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ 647 Да, рассчитанное *M* для mc-vc-pub-MMAE 1316 Да). Выход **HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁** 78,4%. Электронная спектроскопия (буфер PBS, pH 7,4): λ_{\max} 258 нм ($\varepsilon = (12,25 \pm 0,1) \times 10^4$), λ_{\max} 313 нм ($\varepsilon = (8,22 \pm 0,2) \times 10^4$) λ_{\max} 654 нм ($\varepsilon = (6,64 \pm 0,1) \times 10^4$). Масс-спектрометрия (MALDI-TOF) *m/z*: измеренное среднее значение *MW* для HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁ составляет 69830 Да, что соответствует двум остаткам GCB₁₂H₁₁ на одну молекулу HSA (среднее измеренное значение *MW* для HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ 67982 Да, расчетное значение *MW* для GCB₁₂H₁₁ 924 Да). Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой: обнаружено $2,3 \pm 0,09$ м.д. бора при количестве конъюгата в анализируемом образце 0,024 мкмоль. Это соответствует $2,03 \pm 0,02$ остатков HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁ на одну молекулу белка.

РАЗДЕЛ 3. Результаты и обсуждения

3.1. Общий вид стратегии синтеза конъюгатов альбумина

Прежде чем приступить к обсуждению методик получения и характеристик конъюгатов, задействованных в данной работе, целесообразно рассмотреть общий план использованной стратегии. Нами использован блочный метод создания конструкций. В основе конструкции находится молекула человеческого сывороточного альбумина, одновременно выполняющая функцию носителя для остальных блоков конструкции, и функцию адреса, обеспечивающего специфичность нацеливания конструкцией на раковые клетки. Блоки двух видов (терапевтические и сигнальные молекулы) могут быть присоединены к альбумину различными способами. 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 какого-либо вреда для его функционирования (по крайней мере, в тех концентрациях, в которых мы его используем). На рисунке 22 показана полная стратегия, использованная в нашей работе.

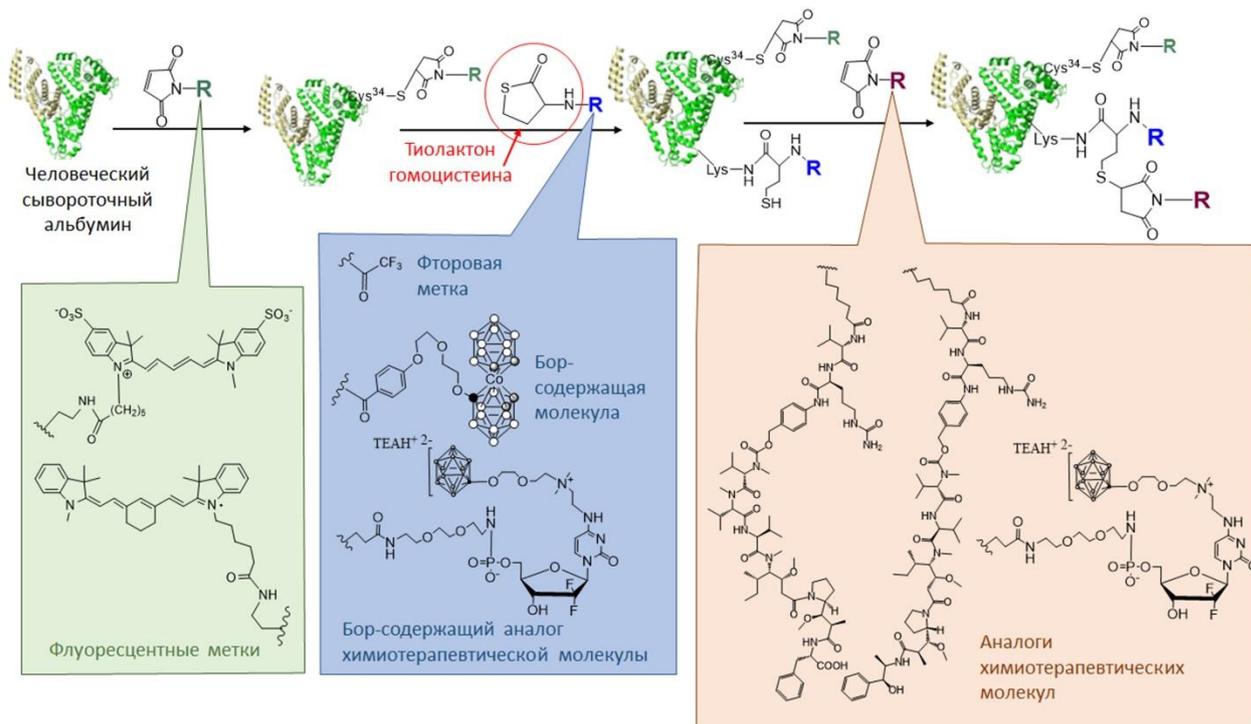


Рис. 22 Общий путь конструирования конъюгатов на основе альбумина для терапии раковых опухолей.

3.2. Создание флуоресцентно меченного альбумина

Альбумин имеет 35 остатков лизина, 34 из которых спарены в 17 дисульфидных связях, и только Cys-34 можно использовать для сайт-модификации. Однако лишь около 30% остатков лизина альбумина существует в свободной форме, а остальные связаны с такими молекулами, как цистеин и глутатион, посредством дисульфидных связей, а также могут подвергаться окислению. Следовательно, остаток Lys 34 не является лучшим остатком конъюгации для связывания ауристатина. В нашей работе мы поместили HSA по остатку Cys-34 флуорофором малеимидным производным сульфо-Cy5, либо малеимидным производным Cy7, флуоресценция которых позволит визуализировать конъюгат *in vitro* и *in vivo*.

Только 25% альбумина, использованном в нашей работе, содержали свободные остатки Cys-34 (определено методом Элмана сотрудниками лаборатории для конкретного коммерчески доступного образца HSA). Поэтому соотношение белка и красителя на этом этапе выбирают таким образом, чтобы обеспечить полную модификацию красителем всех свободных остатков цистеина без мечения белка по остаткам лизина. Когда малеимид взаимодействует с белками при нейтральном pH, его селективность в отношении SH-групп значительно выше, чем в отношении остатков лизина. Главным образом это связано с тем, что аминогруппа остатка лизина переходит в протонированное состояние при нейтральном pH и ее нуклеофильная природа значительно уступает тиоловой группе. Поэтому использовали двукратный избыток белка по отношению к красителю и реакцию проводили при 37 градусах в течение 18 часов. Итоговый конъюгат был очищен от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси с помощью ультрацентрифугирования, как описано в разделе «материалы и методы».

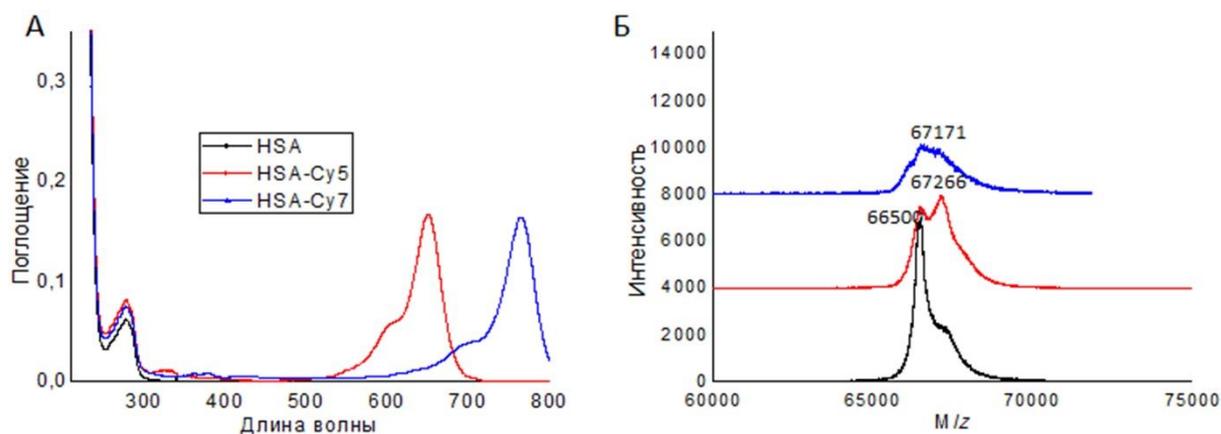


Рис. 23. Характеристики многофункциональных конъюгатов сывороточного альбумина человека. HSA и HSA-Cy5, HSA-Cy7. А: электронные спектры поглощения; Б: MALDI TOF масс-спектры.

В данных электронной спектроскопии наблюдались полосы поглощения при 278 и 648/762 нм, что соответствует наличию в конъюгате белковых компонентов и красителя Cy5/Cy7 соответственно. Расчеты с использованием коэффициентов экстинкции показывают, что в случае Cy5 модифицировано 25% молекул HSA, а в случае Cy7 – 42%.

Пики, соответствующие массам в спектре MALDI-TOF образца белка, широко распределены и имеют колоколообразную форму, поскольку сам белок может переносить множество протонированных и содержит множество естественных модификаций, которые неравномерно распределены по всей популяции белковых молекул. В случае конъюгатов HSA-Cy5 и HSA-Cy7 в масс-спектре MALDI-TOF наблюдалось четкое разделение популяции белковых конъюгатов на немодифицированный HSA и конъюгированные продукты, что давало пик, смещенный на 766 или 671 Да относительно пика HSA, что эквивалентно наличию в пуле продукта молекул белка, где произошло добавление одного остатка красителя к белковой молекуле.

3.3. Синтез конъюгатов альбумина, содержащих Cy5 и MMAF

Первой стратегией связывания терапевтических пептидов MMAF с полученным HSA-Cy5 было прямое связывание.

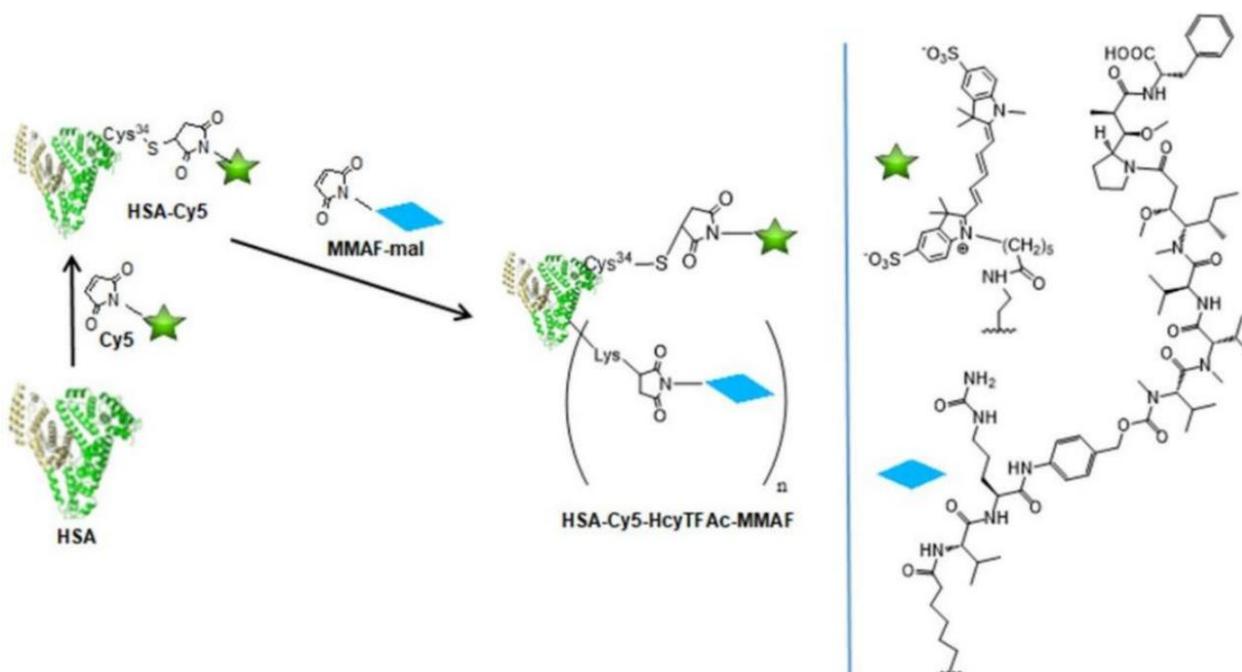


Рис. 24. Стратегия создания терапевтических конъюгатов на основе HSA и MMAF.

В этой стратегии терапевтические пептиды присоединяются к лизиновым остаткам. При этом избыток пептида по отношению к белку был 5 кратным. Схема синтеза представлена на рисунке 24.

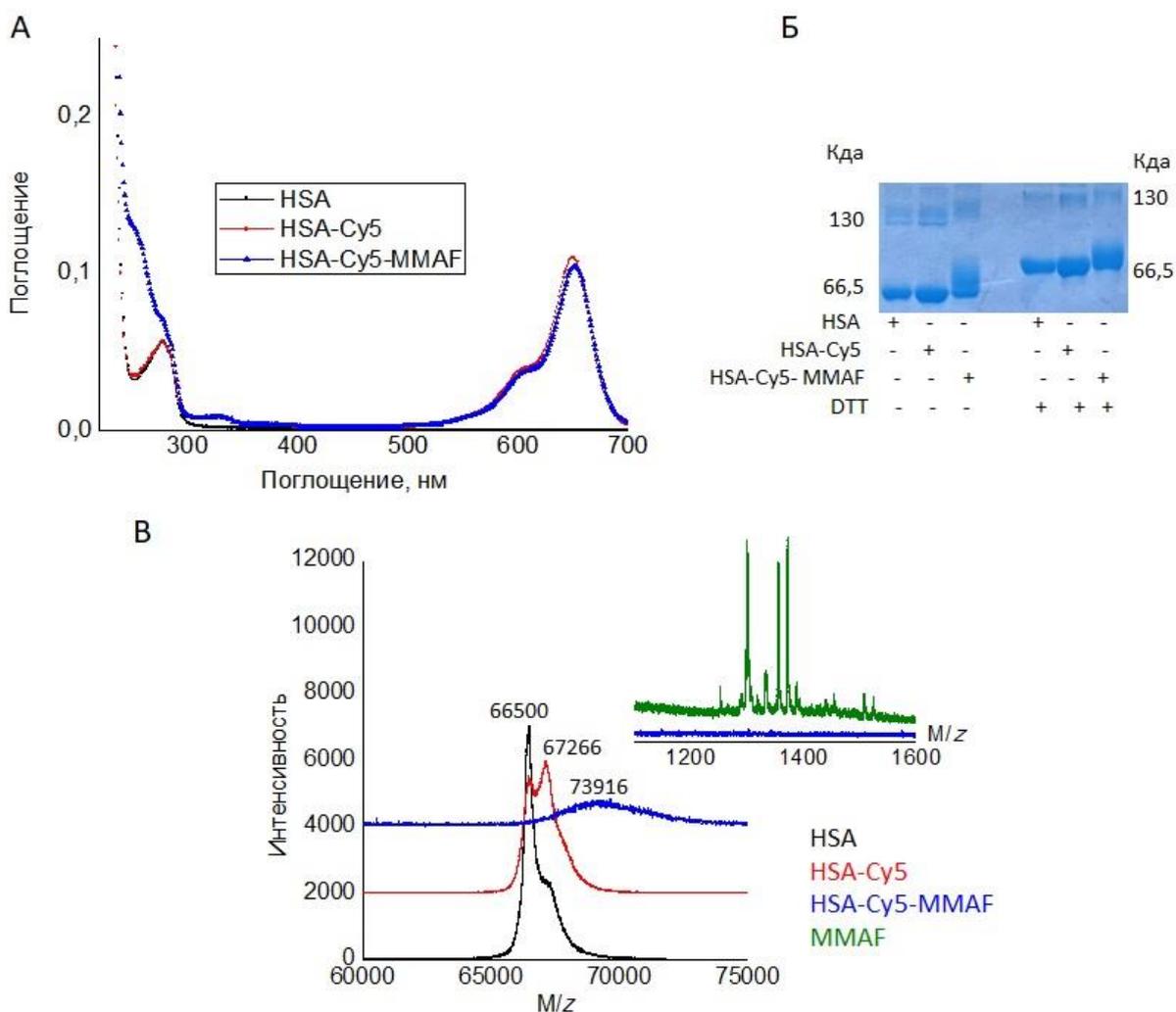


Рис. 25. Характеристики конъюгата HSA-Cy5-MMAF. А: электронные спектры; Б: электрофорез в 7% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS); В: данные MALDI-TOF.

Исходя из данных MALDI-TOF (рис. 25, панель В) произошло присоединение к молекуле белка, в среднем, 5 молекул пептида MMAF. Степень очистки итогового конъюгата HSA-Cy5-MMAF от непрореагировавшего пептида MMAF оценивали по наличию в MALDI-TOF очищенного образца сигналов в области 1000-2000 Да (рис. 25, панель В, вставка). Появление в структуре конъюгата пяти остатков MMAF так же подтверждается изменениями в коротковолновой области электронного спектра

поглощения белка (рис. 25, панель А). Поскольку все остатки Cys-34 в белке уже заняты, очевидно, что присоединение пептида произошло по остаткам лизина.

3.4. Конъюгаты альбумина, содержащих флуоресцентные красители Cy5/Cy7, трифторацетилгомоцистеин (HTLTFAc), ауристатин MMAF/MMAE

Другой стратегией соединения терапевтических пептидов MMAF с полученной конструкцией HSA-Cy5 является использование универсального гомоцистеинового линкера.

Гомоцистеин является полифункциональным линкером за счет наличия как аминогруппы, так и тиоэфира. В нашей лаборатории впервые была предложена и реализована идея использования аналогов тиолактона гомоцистеина для введения различных функциональных групп (фторсодержащих остатков, тамоксифена) в лизиновые остатки HSA [148][152][153][154][155] [156] [157] [158].

Известно, что остатки Lys4, Lys12, Lys137, Lys159, Lys205, Lys212 и Lys525 доменов ШВ и ВВ человеческого альбумина чувствительны к *N*-гомоцистеинилированию.[159][160].

При ацилировании боковых радикалов лизина тиолактоном гомоцистеина происходит высвобождение меркаптогруппы, которую можно далее использовать под присоединение каких-либо еще полезных для функционирования конъюгата молекул.

Молекула тиолактона содержит аминогруппу, по которой заранее (до присоединения к белку) можно так же ввести полезные группировки. Кроме этого, данные экспериментов, сделанных с использованием различных производных тиолактона гомоцистеина, показывают, что гомоцистеин, несущий разные функциональные остатки на своей аминогруппе, может избирательно модифицировать остатки лизина в альбумине, не влияя при этом на его способность проникать в опухолевые клетки [148][156].

В рамках одной из стратегий, задействованных в этой работе, мы использовали тиолактон гомоцистеина, трифторацелированный по аминогруппе. ¹⁹F обладает возможностью применения в спектроскопии ядерного магнитного резонанса и может использоваться в качестве зонда для визуализации экзогенных лекарств *in vivo* методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) [161]. Преимуществом ¹⁹F МРТ является то, что этот атом имеет эндогенный дефицит в организме и поэтому может использоваться в качестве контрастного агента для метки ЯМР для улучшения качества изображения МРТ

Для создания трифторацелированного тиолактона гомоцистеина мы использовали трифторуксусный ангидрид, согласно рис. 26.

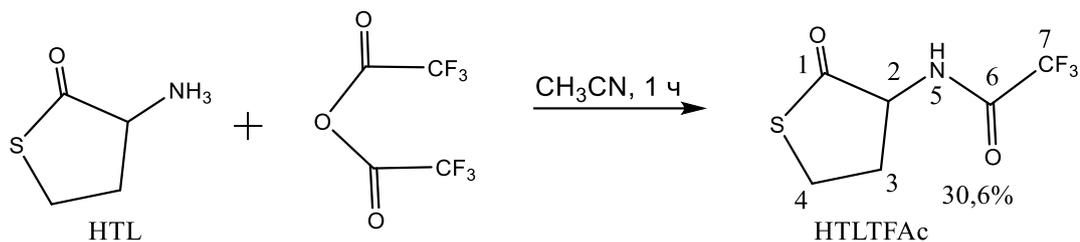


Рис. 26. Синтез тиолактона *N*-трифторацетилгомоцистеина.

Данные ¹H, ¹⁹F и ¹³C ЯМР соответствовали ожидаемой структуре.

Общая схема синтеза конъюгатов, содержащих флуоресцентные метки, трифторацелированный гомоцистеин и терапевтические молекулы (ауристатины, или аналоги гемцитабина) представлена на рисунке 27.

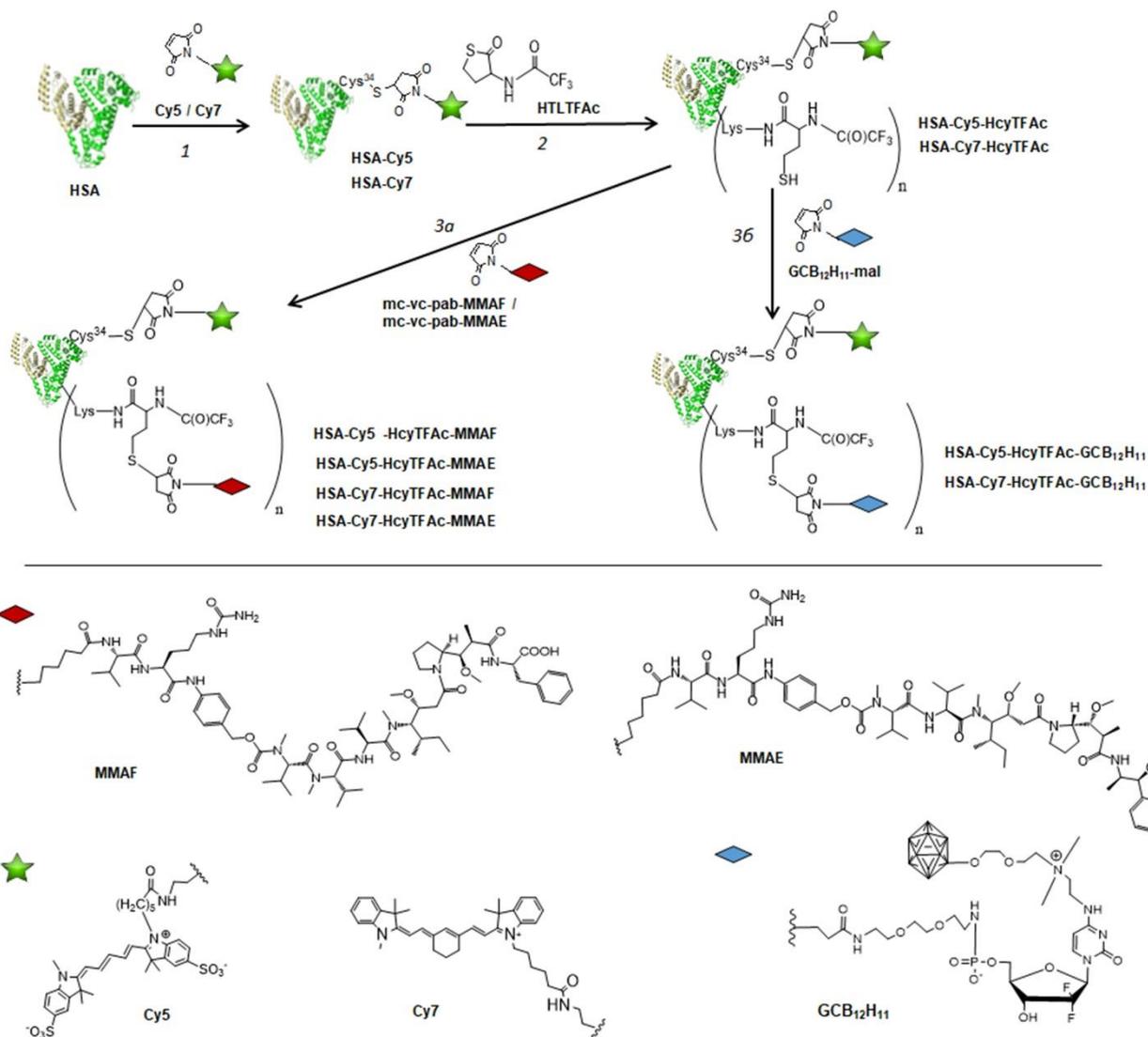


Рис. 27. Стратегия создания терапевтических конъюгатов на основе HSA, содержащих трифторацелированный гомоцистеин и терапевтические остатки (MMAF, MMAE, борсодержащий аналог гемцитабина).

Реакцию гомоцистеилирования (стадия 2, рис. 27) проводили по адаптированной методике [153]. Время проведения реакции было увеличено до 42 часов, по сравнению с тем, что указано в методике. Кроме того, поскольку присоединение ауристатинов через тиолактон гомоцистеина к HSA проводилось впервые, с использованием флуоресцентного альбумина HSA-Cy5 было отработано две методики, включающие разные избытки трифторацелированного тиолактона гомоцистеина (стадия 2) и разные избытки малеимидного производного ауристатина MMAF, содержащего расщепляемый линкер (mc-vc-pab-MMAF, стадия 3a).

В первом методе трифторацетилгомоцистеин (HTLTFAc) используется в 6,5-кратном избытке по отношению к HSA-Cy5, а MMAF - в 3,2-кратном избытке по отношению к полученному конъюгату HSA-Cy5-HcyTFAc.

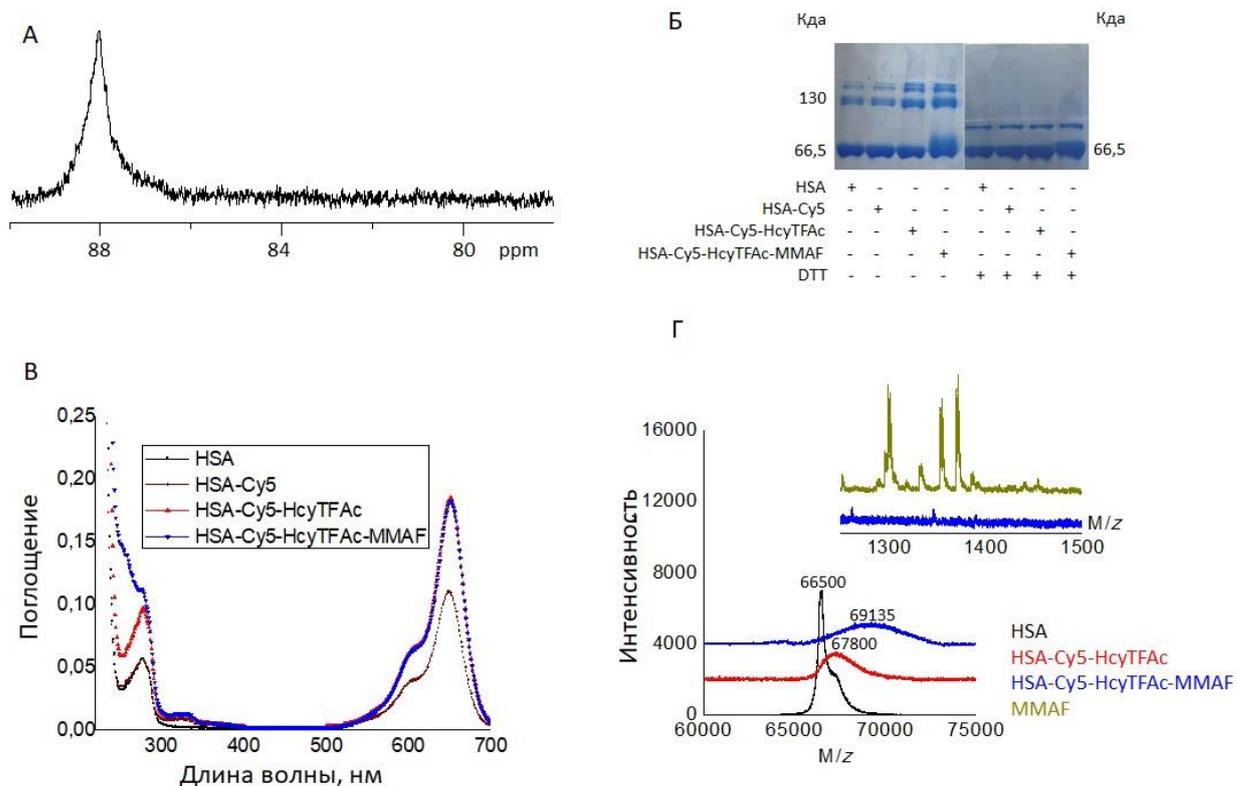


Рис. 28. Характеристики конъюгата HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF, синтезированного первым методом. А: ^{19}F ЯМР в дейтерированном PBS, pH 7,4; Б: электрофорез в 7% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS); В: электронные спектры; Г: данные MALDI-TOF, массы приведены в кДа.

На каждой стадии получаемый белковый конъюгат был очищен от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси (M менее 3000 Да) с помощью центрифуг, как описано в части «материалы и методы».

Исходя из данных MALDI-TOF произошло присоединение к молекуле белка, в среднем, 2,5 остатков HTLTFAc и 1 MMAF. Степень очистки итогового конъюгата от не присоединённого пептида определяли методом масс-спектрометрии (рис. 28, панель Г, внутренняя вставка). При этом полученный конъюгат отдельно исследовали методом MALDI TOF в области 1000 – 2000 Да. Свободный пептид MMAF использовали как контрольный образец. Присоединение HTLTFAc было подтверждено методом ^{19}F ЯМР (рис. 28, панель А). Согласно данным электрофореграммы (рис. 28, панель Б), при модификации

альбумина накапливаются его олигомерные формы. Олигомерные формы модифицированного белка становится меньше при проведении электрофореза в присутствии дитиотреита (ДТТ). Это может свидетельствовать о том, что в образовании олигомерных форм задействовано образование S-S мостиков между мономерами.

Во втором методе для обеспечения большей степени модификации HSA количество модифицирующего агента по отношению к белку увеличивали с 10-кратным избытком HLTTFAc и 6,15-кратным избытком пептида MMAF относительно используемого HSA. На этапе добавления пептида содержание DMSO было увеличено вдвое по сравнению с первой стратегией. Очистка белковых конъюгатов от компонентов реакционной смеси с массой менее 3000 Да так же проводилась на каждой стадии.

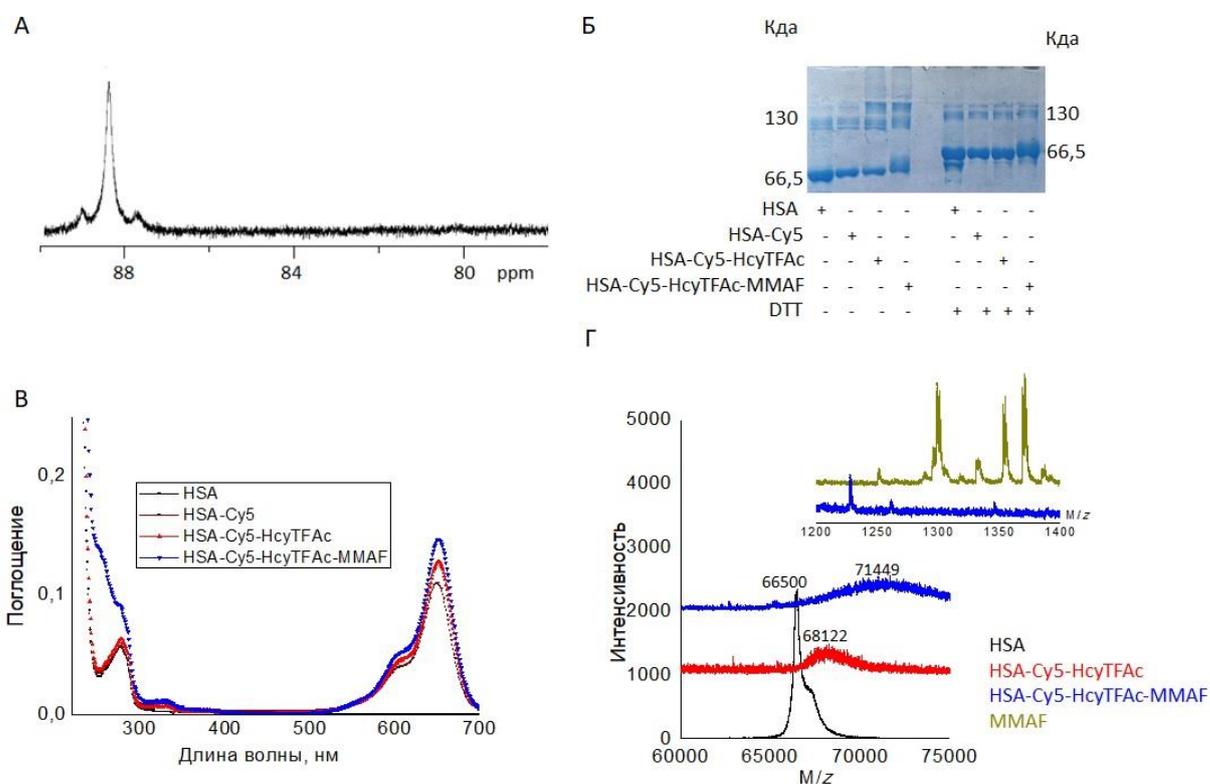


Рис. 29. Характеристики конъюгата HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF (2). А: ^{19}F ЯМР в дейтерированном PBS, pH 7,4; Б: электрофорез в 7% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS); В: электронные спектры; Г: данные MALDI-TOF.

Исходя из данных MALDI tof произошло присоединение к молекуле белка, в среднем, 4 остатков HLTTFAc и, в среднем, 2,5 молекулы пептида MMAF. Присоединение HLTTFAc так же было подтверждено методом ^{19}F ЯМР (рис. 29). Следовательно, большее количество HLTTFAc, участвующих в реакции, позволяет модифицировать больше

остатков лизина в конъюгате HSA-Cy5, дополнительно синтезируя конъюгат, несущий больше молекул MMAF.

Для создания аналогичных конъюгатов с ауристатином MMAE уже была использована стратегия с большими избытками модификантов на стадиях 2 и 3 (рис. 27), так как она дала большую степень модификации терапевтической молекулой.

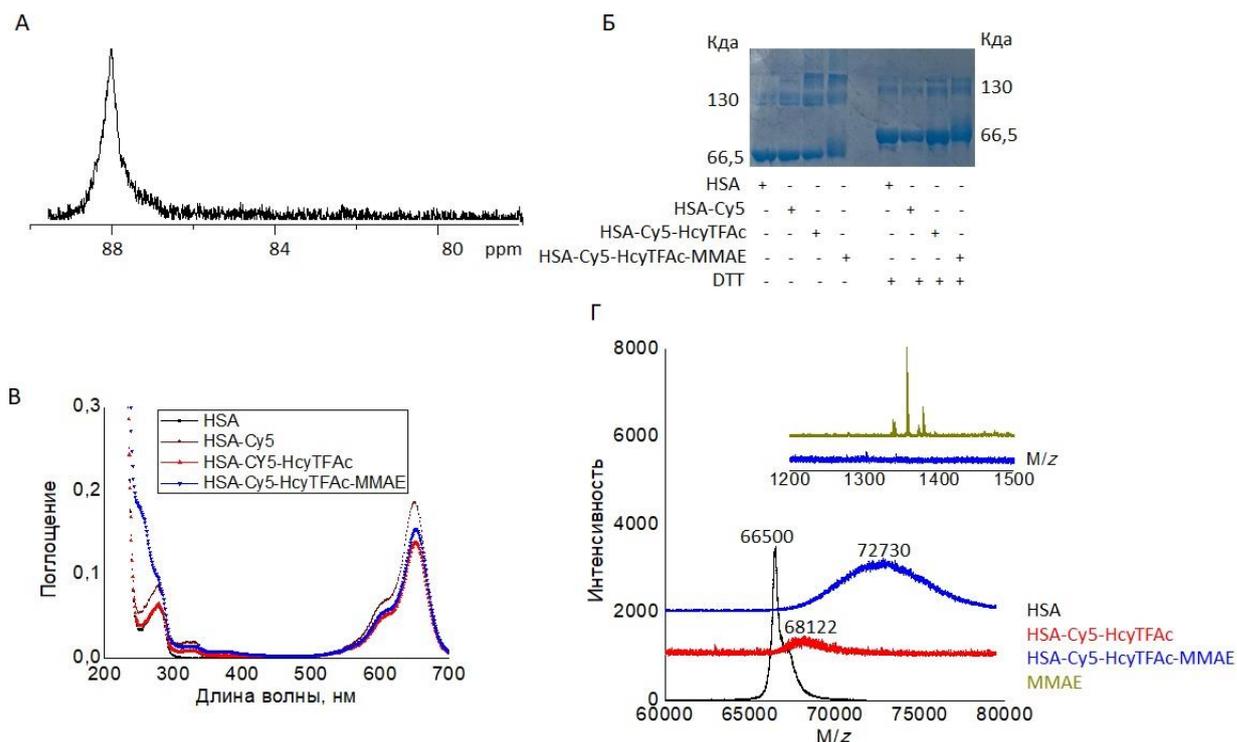


Рис. 30. Характеристики конъюгата HSA-Cy5-HcyTFAC-MMAE. А: ^{19}F ЯМР в дейтерированном PBS, pH 7,4; Б: электрофорез в 7% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS); В: электронные спектры; Г: данные MALDI-TOF.

Характеристики полученного конъюгата HSA-Cy5-HcyTFAC-MMAE приведены на рисунке 30. Судя по данным гелеэлектрофореза (рис. 30, панель Б), масса альбумина при модификации меняется в большую сторону, а также, уже на стадии гомоцистеилирования происходит накопление олигомерных форм альбумина, что можно объяснить увеличением количества свободных меркаптогрупп в составе белка, образующихся при раскрытии тиолактоновых фрагментов гомоцистеина. Исходя из данных MALDI tof (рис. 30, панель Г), в этой серии синтезов произошло присоединение к молекуле белка, в среднем, одного остатка красителя Cy5, 4 остатков HcyTFAC 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. 30Г, вставка). Присоединение НТLТFAc так же было подтверждено методом ^{19}F ЯМР (рис. 30, панель А). Наличие в молекуле итогового конъюгата красителя Cy5 подтверждается данными электронной спектроскопии (рис. 30, панель В).

Модифицированные красителем Cy5 белки обычно используются для проведения исследований *in vitro* на различных культурах клеток. Для проведения экспериментов *in vivo* необходим краситель, обладающий спектральными свойствами, подходящими для живой ткани. Таким красителем является Cy7.

Конъюгаты HSA-Cy7-HcyTFAc-MMAE и HSA-Cy7-HcyTFAc-MMAF были синтезированы согласно методикам, описанным в данной работе для аналогичных конъюгатов с Cy5. По ходу синтеза использовались 10-кратный избыток тиолактона гомоцистеина НТLТFAc и 6,15-кратный избыток пептида по отношению к белку.

Характеристики полученных конъюгатов показаны на рис. 31.

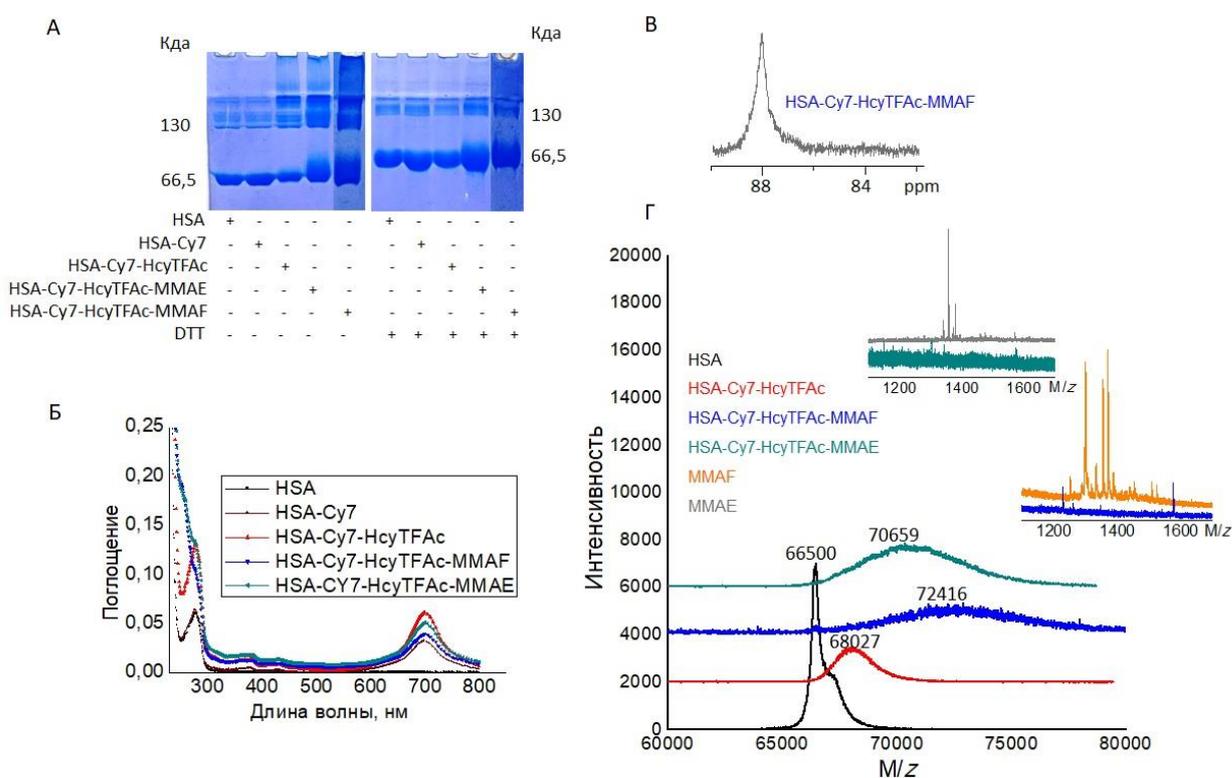


Рис. 31. Характеристики конъюгатов HSA-Cy7-HcyTFAc-MMAE и HSA-Cy7-HcyTFAc-MMAF. А: электрофорез в 7% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия

(SDS); Б: электронные спектры; В: ^{19}F ЯМР в дейтерированном PBS, pH 7,4; Г: данные MALDI-TOF.

Согласно данным электронной спектроскопии (рис. 31, панель Б) и масс-спектрометрии (рис. 31, панель Г), конъюгаты содержат краситель Cy7 (42% степень модификации). ^{19}F ЯМР и масс-спектрометрия подтверждают наличие в конъюгатах 4 остатков трифторацелированного гомоцистеина (рис. 31, панели В и Г). Количество присоединенных пептидов соответствует 3,3 в случае MMAF и 2 в случае MMAE (рис. 31, панель Г). Результаты электрофоретического анализа конъюгатов HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAE и HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAF сходны с теми, что получены для их аналогов с Cy5 (рис. 31, панель А).

В таблице 4 указано количество модифицированных остатков, содержащихся в синтезированных конъюгатах, содержащих ауристатины, красители сульфо-Cy5 и Cy7 и трифторацелированный гомоцистеин.

Конъюгат	Количество НсуТFAc	Количество ауристатина
HSA-Cy5-НсуТFAc-MMAF (способ 1)	2,5	1
HSA-Cy5-НсуТFAc-MMAF (способ 2)	4	2,5
HSA-Cy5-MMAF	0	5
HSA-Cy5-НсуТFAc-MMAE	4	3,5
HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAF	4	3,3
HSA-Cy7-НсуТFAc-MMAE	4	2

3.3.2. Исследование токсичности конъюгатов HSA-Cy5-НсуТFAc-MMAF (способ синтеза 2), HSA-Cy5-MMAF, HSA-Cy5-НсуТFAc-MMAE, на клеточных культурах.

Три конъюгата: HSA-Cy5-НсуТFAc-MMAF (синтезированный по методу 2), HSA-Cy5-MMAF и HSA-Cy5-НсуТFAc-MMAE были использованы в экспериментах по изучению токсичности культур опухолевых клеток.

Ингибирование роста клеток оценивали с помощью МТТ-теста, основанного на восстановлении МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) до формазана митохондриальной НАД(Ф)Н-зависимой оксидоредуктазой.

На рисунке 32 приведены результаты МТТ теста на линиях клеток MCF 7 и T98G.

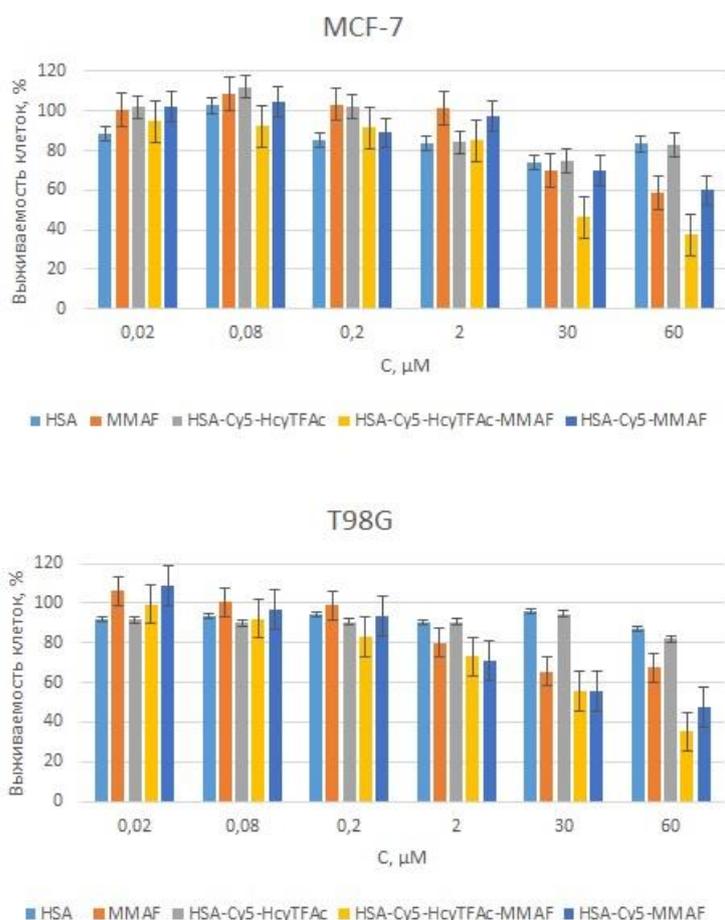


Рис. 32. Исследование токсичности HSA-Cy5-HcyTFAc, HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF и HSA-Cy5-MMAF на линии клеток рака молочной железы человека MCF 7 и линии клеток глиобластомы человека T98G.

Результаты исследования цитотоксичности свидетельствуют о том, что конъюгат, содержащий остатки трифторацетилгомоцистеина обладает большей токсичностью в отношении 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. Это можно объяснить тем, что, вероятно, присоединение пептида по некоторым остаткам лизина в альбумине может нарушать эффективность проникновения полученной конструкции в раковые клетки. В любом случае, полученный результат еще раз подтверждает целесообразность использования производных тиолактона гомоцистеина для модификации альбумина.

Результаты исследования цитотоксичности контрольного образца, в котором содержался исходный пептид MMAF были преобразованы в экспоненциальную кривую с использованием программы Origin. С помощью этой кривой был приведён пересчет

токсичности этого контрольного образца таким образом, чтобы концентрация пептида в контроле совпадала с концентрацией пептида в образце. Результаты представлены на рис. 33.

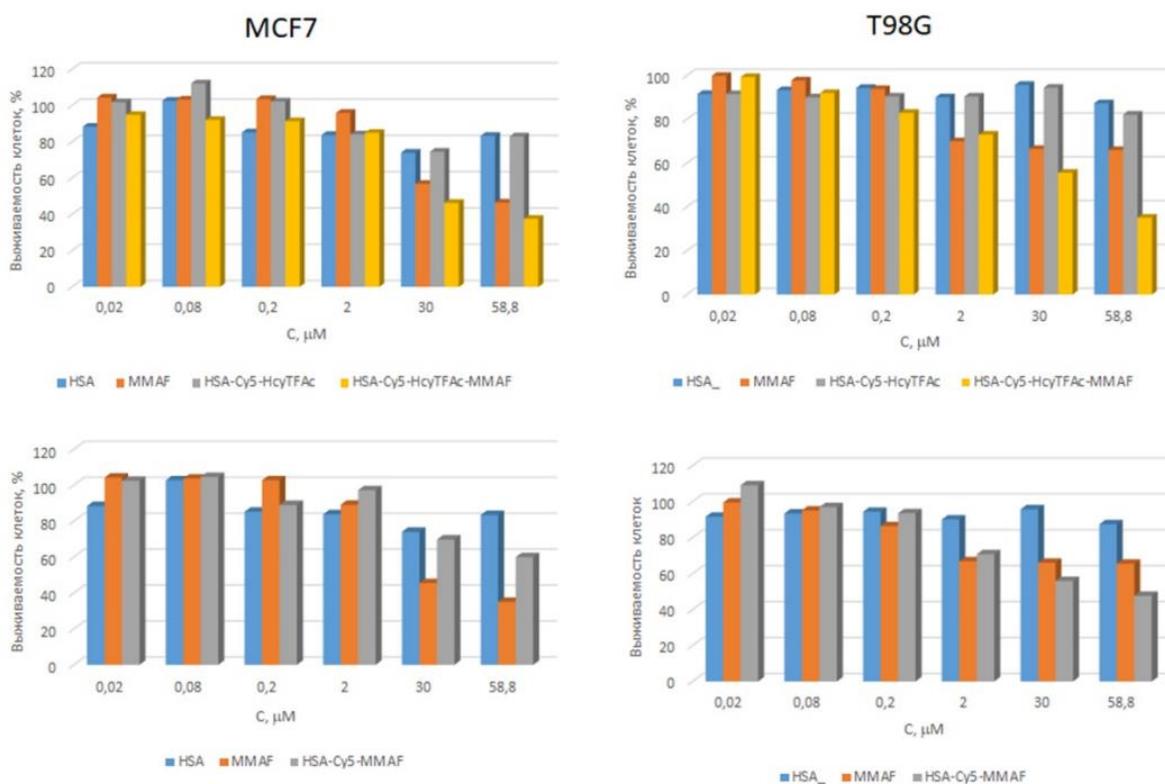


Рис. 33. Исследование токсичности HSA-Cy5-HcyTFAC-MMAF и HSA-Cy5-MMAF на линии клеток рака молочной железы человека MCF-7 и линии клеток глиобластомы человека T98G. Концентрации нормированы относительно количества MMAF.

Исходя из результатов, показанных на рисунке 33, 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.

Рассмотрим результаты пересчета токсичности для линии T98G. Надо заметить, что по нашим данным спад экспоненциальной кривой токсичности самого пептида на клетках MCF-7 был довольно плавный, в отличие от такового для случая с линией клеток T98G, где плато достигалось быстро.

Как видно из рисунка 33, оба типа конъюгатов оказываются более токсичными в отношении линии T98G, чем свободный пептид MMAF.

Конъюгат HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE, как и сам пептид, оказался гораздо более цитотоксичным в отношении тех же линий клеток, чем аналог с MMAF, о чем свидетельствует рис. 27.

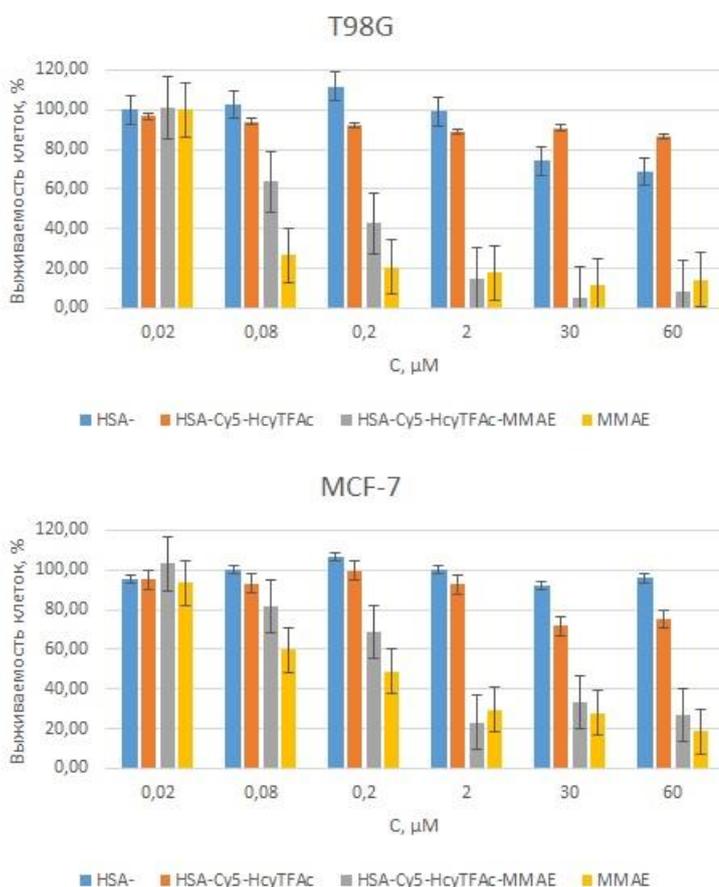


Рис. 34. Исследование токсичности HSA, HSA-Cy5-HcyTFAc и HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE на линии клеток рака молочной железы человека MCF-7 и клеток глиобластомы человека T98G.

Вероятно, это связано с некоторой способностью свободного пептида MMAE проходить через клеточную мембрану, что обсуждается нами в литературном обзоре данной работы.

Так же очевидно, что в случае этих линий раковых клеток конъюгат альбумина с MMAE в диапазоне концентраций 2 – 60 мкмоль/л чуть более цитотоксичен, или так же цитотоксичен, как и сам пептид. Токсичность HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE и самого пептида очень быстро выходят на плато. Поэтому, пересчет токсичности MMAE таким образом, чтобы концентрация пептида в контроле совпадала с концентрацией пептида в образце

HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE, не вносит каких-нибудь существенных изменений в процент выживших клеток при концентрациях пептида в диапазоне 2 – 60 мкмоль/л.

В заключении обсуждения этих результатов, следует отметить, что селективность накопления антиракового препарата в нужной ткани внутри организма складывается из нескольких факторов и зависит не только от того, насколько успешно данный препарат может преодолеть клеточную мембрану раковой клетки. Поэтому, чтобы оценить разницу токсичности свободного пептида и его конъюгата с альбумином относительно раковой ткани, необходимы эксперименты *in vivo*. Для этой цели нами и были сконструированы аналоги описанных конъюгатов, содержащие флуоресцентную метку Cy7. Эти исследования на данный момент в процессе проведения.

3.4. Синтез конъюгатов HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁ и HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁.

Глиома обладает иммуносупрессивным микроокружением, гипоксией и неоангиогенезом, которые очень хорошо организованы и создают собственную высокопротуморогенную среду опухоли. В конечном итоге становится трудно контролировать опухоль, используя только сбалансированное современное лечение, состоящее из максимальной резекции, лучевой терапии и химиотерапии темозоламидом [162].

Хотя БНЗТ в настоящее время считается наиболее перспективным методом лечения глиобластомы, но и он, зачастую, оказывается недостаточно эффективным. Комбинированная терапия становится все более важной стратегией лечения, поскольку применение нескольких препаратов может максимизировать терапевтический эффект и преодолеть потенциальные механизмы лекарственной устойчивости [163][164].

Как химиотерапевтическое средство, гемцитабин (2',2'-дифтордезоксцитидин) оказался активным агентом против рака толстой кишки, поджелудочной железы, молочной железы, яичников, мелкоклеточного рака легких, головы и шеи, а также легких в сочетании с различными другими противораковыми агентами. На данный момент он считается золотым стандартом и первым одобренным FDA препаратом, используемым в качестве монотерапии при лечении распространенного рака поджелудочной железы. Однако из-за его плохой фармакокинетики для его эффективного использования необходима усовершенствованная система доставки в пораженные клетки [165].

Гемцитабинтрифосфат конкурирует с дезоксицитидинтрифосфатом в синтезе ДНК [166] и ингибирует фермент рибонуклеотидредуктазу, восстанавливающую рибонуклеотиды до дезоксирибонуклеотидов. Возникающий в результате дефицит цитидин-5'-трифосфата приводит к повышенному включению трифосфатной формы гемцитабина в ДНК [167][168].

В рамках БНЗТ совмещение сигнальной метки с борсодержащей молекулой в единую структуру особенно важно, так как необходима значительная точность дозировки препарата для избегания лишней иррадиации. Такая дозировка зависит от конкретного случая накопления препарата опухолью и должна подбираться персонально для каждого пациента непосредственно перед процедурой облучения.

Мы сконструировали тераностик на основе альбумина, содержащий флуоресцентные краситель, трифторацелированный гомоцистеин и аналог гемцитабина *клозо*-додекабората, который может сочетать бор-нейтронозахватную терапию (БНЗТ) и химиотерапию и позволяет контролировать конъюгаты *in vivo*. Для этого было использовано предоставленное сотрудниками нашей лаборатории (Рогалевой В. И. и Абрамовой Т. В.) производное гемцитабина, имеющее малеимидную группу и остаток *клозо*-додекабората. Гемцитабин, содержащий борный кластер может увеличить количество атомов бора на одну молекулу конъюгата, что было бы выгодно для БНЗТ.

Схема синтеза HSA-Cy5/Cy7-HcyTFAc приведена на рис 27. На стадии 2 был использован 6,5 кратный избыток тиолактона трифторацетилгомоцистеина (HTLTFAc), на стадии 3б использовался 4,5 кратный избыток малеимидного аналога гемцитабина, несущего борный кластер на азотистом основании. На каждой стадии была проведена очистка получаемого белкового конъюгата от компонентов реакционной смеси, имеющих массу менее 3000 Да. Способ очистки приведен в части «материалы и методы». Характеристики итоговых конъюгатов приведены на рисунке 35.

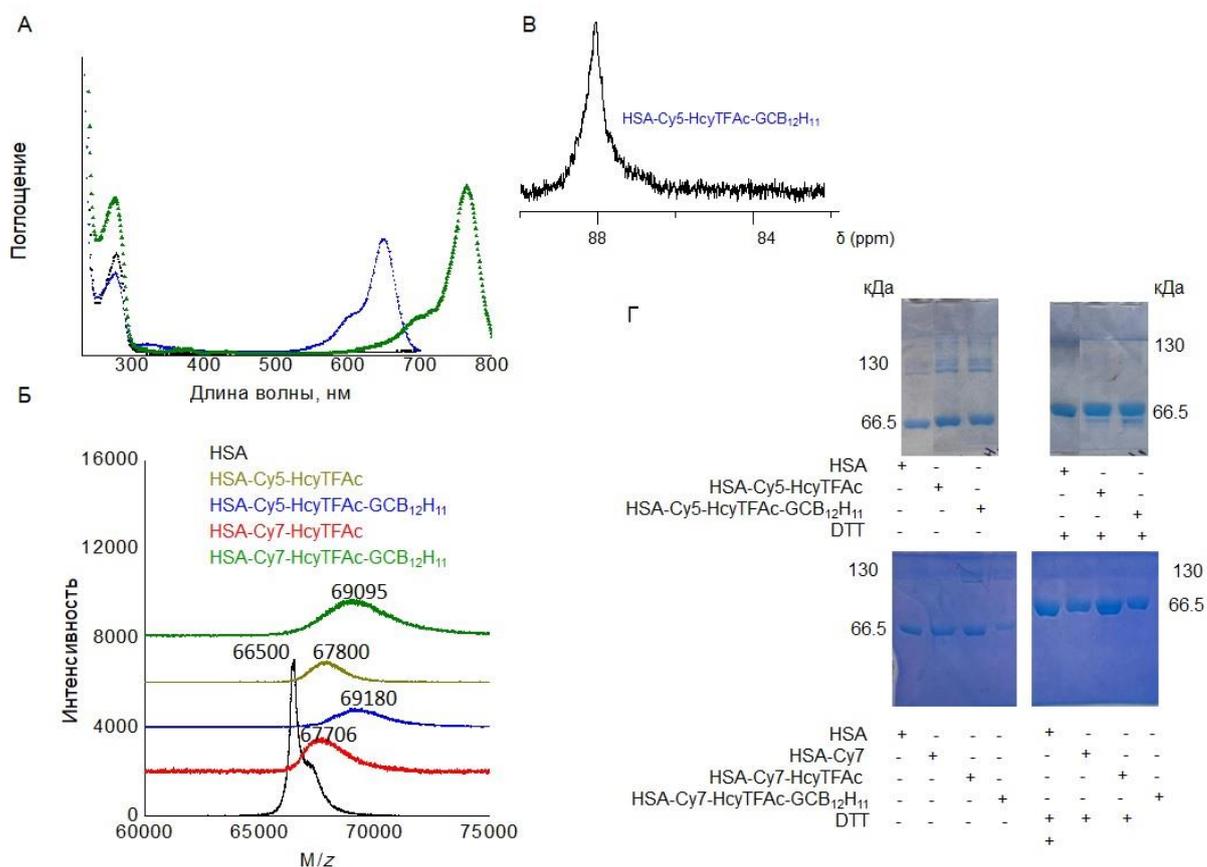


Рис. 35. Характеристики конъюгатов **HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁** и **HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁**. А: электронные спектры; Б: данные MALDI-TOF; В: ¹⁹F ЯМР в дейтерированном PBS, pH 7,4; Г: электрофорез в 7% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS).

Данные электронной спектроскопии свидетельствуют о наличии остатков флуоресцентных красителей в составе конъюгатов (рис. 35, панель А). Согласно данным масспектрометрии, в составе каждого конъюгата находится, в среднем, две с половиной молекулы трифторацетата гомоцистеина (HcyTFAc) (рис. 35, панель Б). Присоединение *N*-трифторацетилгомоцистеина также подтверждалось наличием сигнала при 88 м.д. в спектре ¹⁹F ЯМР для всех конъюгатов HSA (рис. 35, панель В); данные для конъюгатов с Cy7 аналогичны и здесь не показаны). Модификация HSA приводит к накоплению олигомерных форм белка, нестабильных к действию дитиотреита (рис. 35, панель Г).

Модификация HSA-Cy5-HcyTFAc или HSA-Cy7-HcyTFAc 4,5 избытком аналога гемцитабина приводила к добавлению 1,5 остатков аналога гемцитабина на молекулу белка в случае конъюгатов HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁ и HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁. Это было подтверждено данными масс-спектропии MALDI-TOF (рис. 35, панель Б).

Количество присоединённых борсодержащих аналогов гемцитабина было подтверждено методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. Количество бора в образцах в 18 раз превышало количество альбумина в нем, что соответствует 1,5 остаткам *клозо*-додекарбората на одну молекулу белка.

3.4.2. Анализ цитотоксичности конъюгатов HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁ и HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁ в отношении клеток глиобластомы человека T98G.

Исследования цитотоксичности конъюгатов, описанные в данной главе, были непосредственно проведены Дымовой М.А. (ИХБФМ СО РАН). Облучение образцов эпитеpmальными нейтронами проводилось сотрудниками ИЯФ СО РАН.

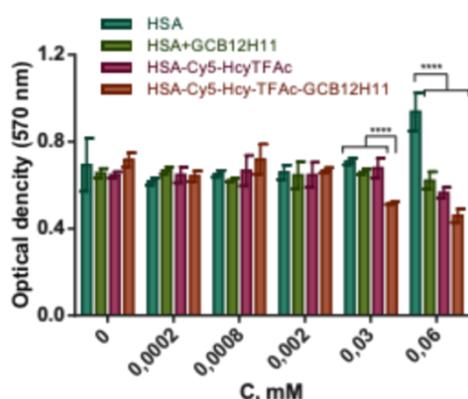


Рис. 36. Жизнеспособность клеток T98G при действии HSA, смесью HSA + гемцитабин, HSA Cy5 HcyTFAc и HSA Cy5-Hcy-TFAc-GCB₁₂H₁₁ в различных концентрациях. Сообщенные значения представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Используемые концентрации были взяты для компонента HSA. Концентрация гемцитабина и его аналога в составе HSA+гемцитабин и HSA Cy5-Hcy-TFAc-GCB₁₂H₁₁ составляла 1,5 части концентрации HSA.

Влияние конструкции HSA-Cy5-Hcy-TFAc-GCB₁₂H₁₁ на жизнеспособность клеточной линии глиобластомы T98G определяли с помощью стандартного колориметрического анализа МТТ. Результаты показаны на Рисунке 36. В целом не было существенных различий в жизнеспособности клеток глиобластомы, инкубированных с различными конъюгатами альбумина; однако жизнеспособность клеток T98G снижалась в присутствии 0,03 мМ или более HSA Cy5-Hcy-TFAc-GCB₁₂H₁₁ (значение $p \leq 0,0001$).

Увеличение выживаемости клеток в присутствии HSA (значение $p < 0,0001$) можно объяснить стимуляцией их роста альбумином как пищевым ресурсом.

Выживаемость клеток в присутствии смеси HSA и гемцитабина не снижалась в

диапазоне использованных концентраций гемцитабина. В присутствии конъюгата HSA-Cy5-Hcy-TFAC-GCB₁₂H₁₁ те же концентрации относительно гемцитабина приводили к снижению количества выживших клеток. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) для HSA Cy5-Hcy-TFAC-GCB₁₂H₁₁ составила 0,47 мМ с коэффициентом корреляции R = 0,82. Это можно объяснить тем, что гемцитабин лучше проникает в раковые клетки в составе конъюгата, чем в составе нековалентного комплекса с альбумином. Другим объяснением может быть более высокая эффективность аналога гемцитабина по сравнению с самим гемцитабином. В любом случае ковалентное связывание аналога гемцитабина с конструкцией альбумина повышает его эффективность.

Без нейтронного облучения клеточная линия сохраняла скорость пролиферации более 70% при обработке борированным конъюгатом, содержащим гемцитабин, HSA-Cy5-Hcy-TFAC-GCB₁₂H₁₁ в диапазоне его концентраций 0,03–0,06 мМ (рис. 36). Таким образом, концентрация конъюгата около 0,03 мМ может быть использована для оценки влияния препарата на образование колоний клеток глиомы в экспериментах по нейтронному облучению.

Эксперимент по БНЗТ был проведен с использованием конъюгата HSA-Cy7-HcyTFAC-GCB₁₂H₁₁ в качестве агента доставки бора. ¹⁰B-Боронофенилаланин был задействован в качестве положительного контроля для БНЗТ. Для оценки эффективности БНЗТ использовали клоногенный анализ.

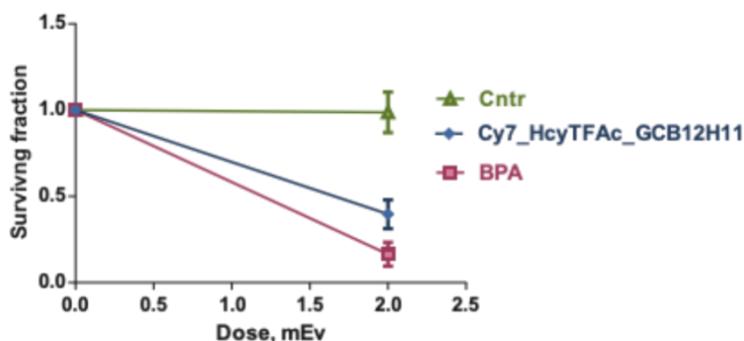


Рис. 37. Выжившие фракции облученных нейтронами клеток глиобластомы человека T98G в зависимости от инкубации конъюгата HSA-Cy7-HcyTFAC-GCB₁₂H₁₁ или BPA.

Доля выживаемости клеток глиобластомы человека T98G при инкубации с конъюгатом и последующем облучении эпитепловыми нейтронами составила ≈0,4 (рис. 37), что достоверно отличалось от контрольной группы (p<0,0001). Таким образом, конъюгат HSA-

Cy7-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁ 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).

Колоногенный анализ выявил снижение жизнеспособности при использовании ¹⁰B-боронофенилаланина, содержащего изотоп бора-10 с наименьшей выжившей фракцией клеток по сравнению с конъюгатом HSA-Cy7-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁ (p<0,01). Стоит отметить, что здесь мы использовали конъюгат HSA-Cy7-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁, изготовленный из природного бора, который содержит 20% изотопа ¹⁰B. Контрольный ВРА содержит только ¹⁰B. С учетом количества атомов бора в одном остатке и числа *клозо*-додекаборатных остатков, присоединенных к альбумину, количество ¹⁰B в контроле в пять раз больше, чем в конъюгате. С одной стороны, использование конъюгата, содержащего чистый ¹⁰B, приведет к большей терапевтической эффективности. С другой стороны, поскольку выделение чистого изотопа ¹⁰B является достаточно дорогостоящей технологией, использование природного бора для БНЗТ может упростить и удешевить получение борсодержащих соединений.

Эффективность конъюгата HSA-Cy7-НсуТFAc-GCB₁₂H₁₁ (Алборгем) в отношении ксенографтов глиобластомы человека при ортотопической трансплантации клеток U87 иммунодефицитным мышам была исследована сотрудниками ИЦиГ СО РАН и ИЯФ СО РАН. Препарат Алборгем показал высокую эффективность в сдерживании роста ксенографтов глиобластомы человека U87 у иммунодефицитных мышей SCID при БНЗТ. Низкая токсичность препарата сочетается с его способностью поддерживать высокую жизнеспособность животных с летальными ксенографтами.

Полученные данные дают надежду на успешную терапию глиобластом с использованием тераностика Алборгем и требуют дальнейших всесторонних исследований этого препарата.

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

При проведении БНЗТ необходимо накопление. Повышенная загрузка альбуминового кора атомами ¹⁰B при той же эффективности накопления молекул конъюгата в раковой клетке может снизить дозировку препарата и, как следствие,

уменьшить его возможные побочные эффекты. По сравнению с *клозо*-додекаборатом, *бис*(дикарболид) кобальта содержит большее количество атомов бора. 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.

Производное тиолактона гомоцистеина, имеющее *бис*(дикарболид) кобальта (НТL-Co(B₉C₂H₁₁)₂) было любезно предоставлено Москалевым И. А. (ИХБФМ СО РАН).

На первых стадиях был синтезирован HSA-Cy5 (синтез проведен аналогично уже описанному. Далее полученный флуоресцентный альбумин был обработан 6,5 кратным избытком НТL-Co(B₉C₂H₁₁)₂ (рис. 38).

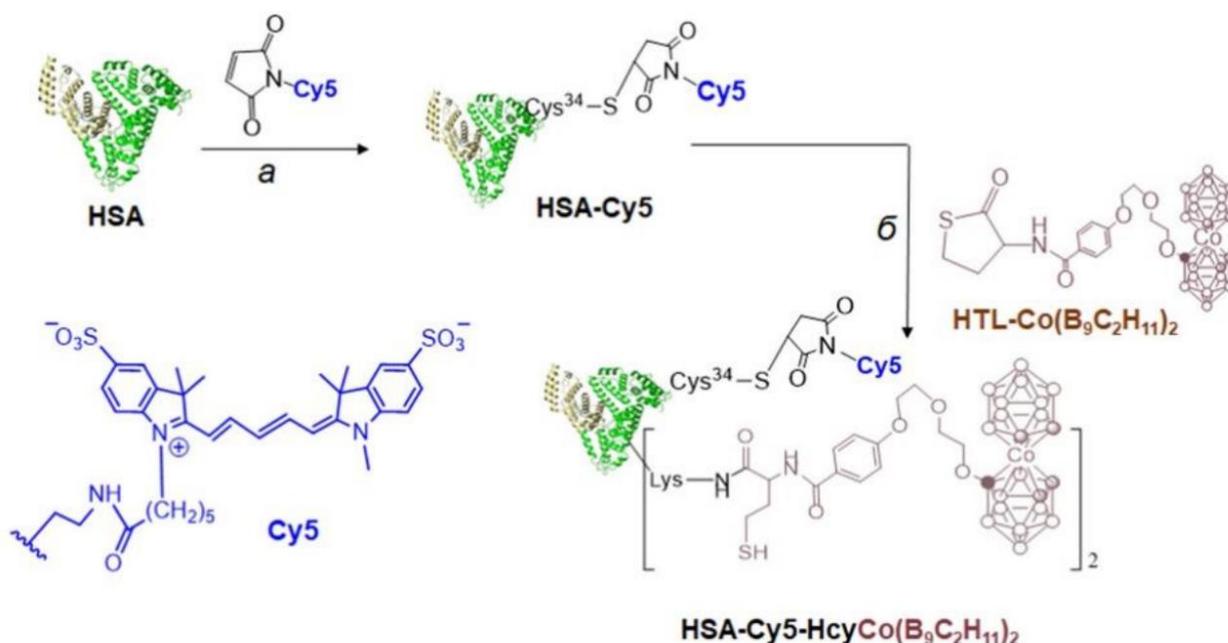


Рис. 38. Схема конструирования альбуминового конъюгата HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂.

Полученный конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ был модифицирован несколькими химиотерапевтическими молекулами, содержащими остатки малеимида: аналогами ауристатина (mc-vc-pab-MMAF и mc-vc-pab-MMAE) и производным гемцитабина GCB₁₂H₁₁mal (рис. 39). При нейтральных значениях pH, высвобождающиеся при ацилировании HSA производными тиолактон-гомоцистеина SH-группы позволяют

присоединять дополнительные химиотерапевтические реагенты, содержащие малеимидные группы.

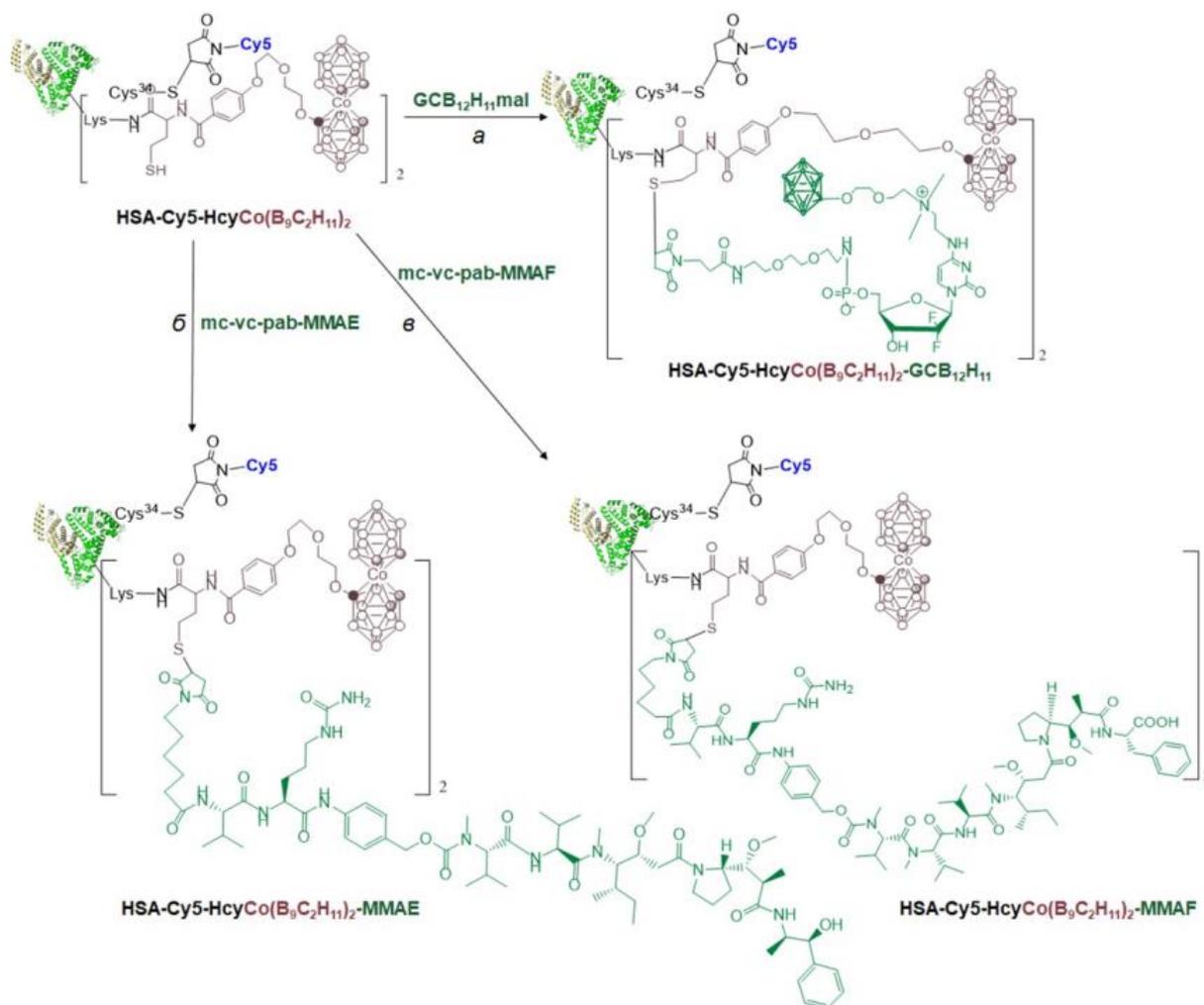


Рис. 39. Путь конструирования новых конъюгатов БНЗТ: HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁; HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF и HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE.

3.5.1 Характеристики конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE

Характеристики полученных конъюгатов изображены на рисунке 40. По данным электронной спектроскопии степень модификации флуоресцентным красителем Cy5 25 % (рис. 40, панель А). По данным масс-спектрометрии MALDI TOF, молекулярная масса конъюгата HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ отличается от молекулярной массы HSA-Cy5 на 716 кДа. Это соответствует добавлению двух молекул HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ на молекулу белка (рис. 40, панель Б). Степень модификации HSA-Cy5 производным тиолактона гомоцистеина HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ подтверждается данными метода атомно-эмиссионной спектроскопии.

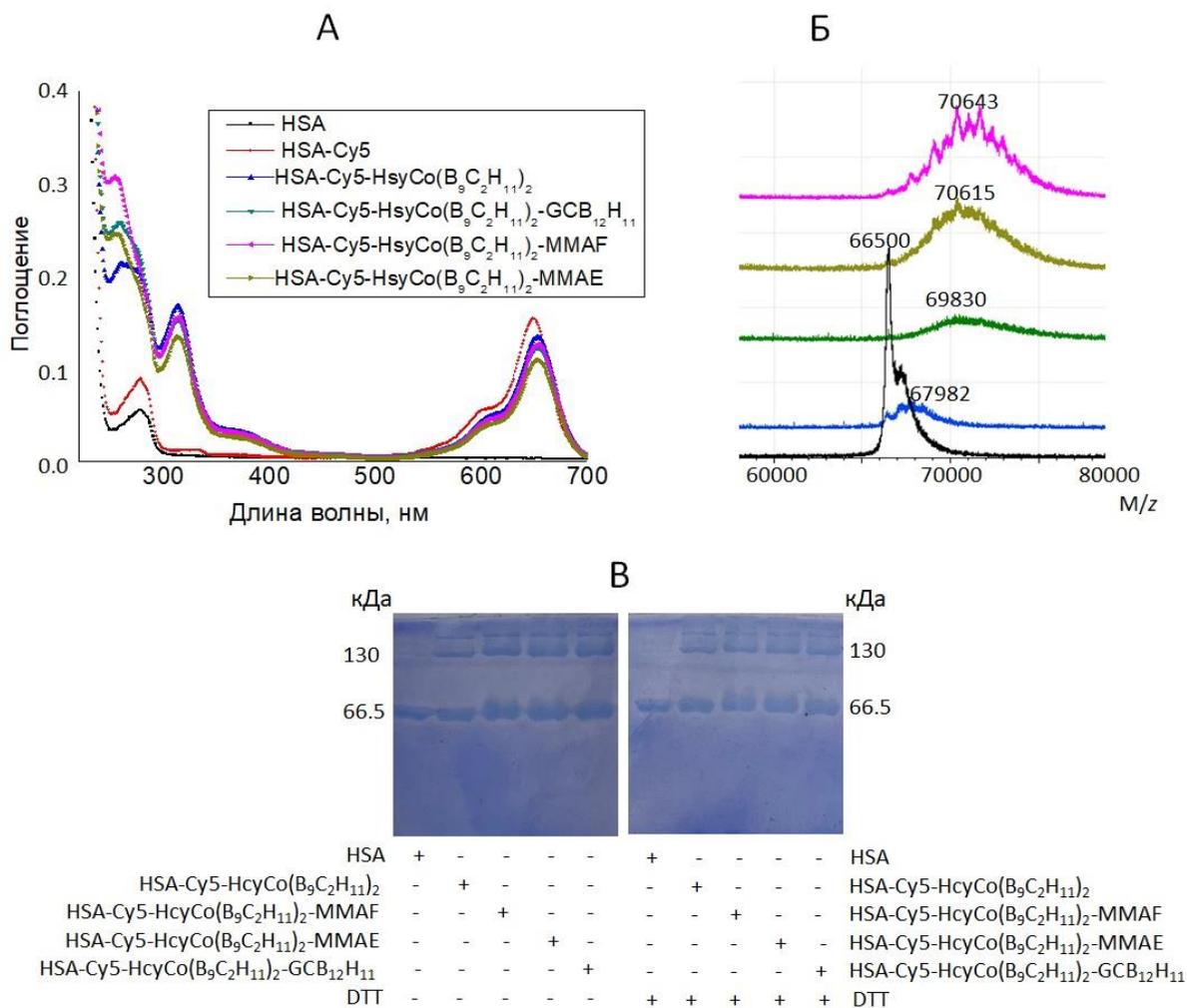


Рис. 40. Характеристики многофункциональных конъюгатов сывороточного альбумина человека. (А): Электронные спектры поглощения HSA и его гомоцистамидов в буфере PBS, pH 7,4; (Б): MALDI-TOF-спектры; (В): SDS-PAGE гомоцистамидных конъюгатов HSA в условиях Леммли с последующим окрашиванием кумасси синим.

Модификация HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ малеимидными аналогами химиотерапевтических остатков приводит к незначительному снижению подвижности модифицированных конъюгатов альбумина при электрофорезе в белковом геле, что можно объяснить увеличением массы конъюгатов (рис. 40, панель Б). Данные масс-спектрометрии MALDI указывают на увеличение массы конъюгата HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂ на 1848, 2633 и 2661 Да в случае синтеза из него конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE и HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF соответственно. Это соответствует добавлению 2 остатков каждого малеимидного реагента на молекулу белка (рис. 40, панель Б). Спектры поглощения указывают на увеличение поглощения в диапазоне длин волн 250-350 нм, что также указывает на присоединение пептидных и

нуклеотидных групп к молекуле белка (рис. 40, панель А).

3.5.2 Анализ цитотоксичности конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE в отношении клеток глиобластомы человека (линии клеток T98G и U87).

Влияние конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE на жизнеспособность клеток глиомы человека (U87 и T98G) было проведено Захаровой О. Д. (ИХБФМСО РАН) с использованием стандартного колориметрического МТТ-анализа, данные приведены на рисунке 41.

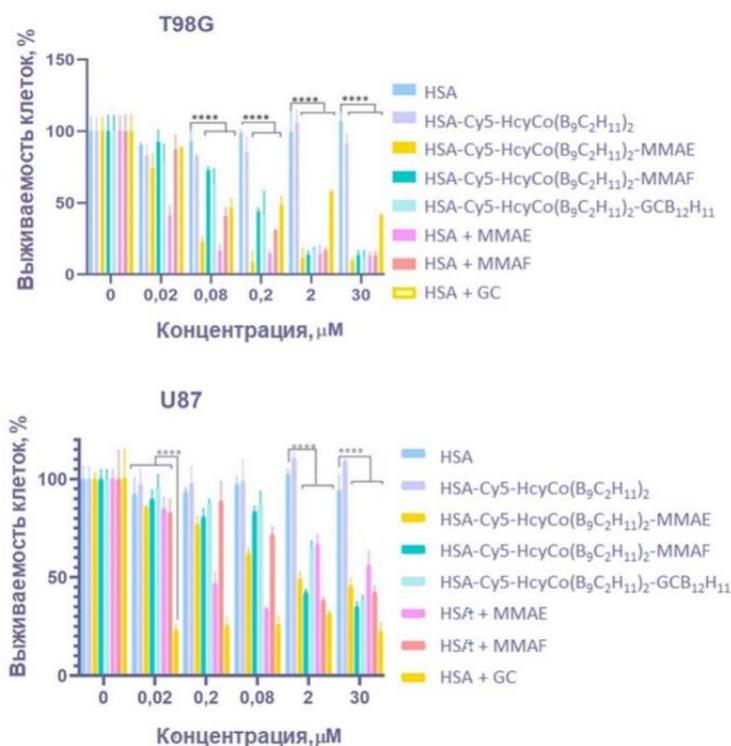


Рис. 41. Жизнеспособность клеток T98G и U87 после инкубации в присутствии конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE и контролей (исходный альбумин, химиотерапевтические молекулы).

Все разработанные конъюгаты на основе альбумина показали хорошую цитотоксичность в отношении клеток глиомы человека (U87 и T98G). Цитотоксичность конъюгата HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂, не модифицированного малеимидными реагентами,

была незначительной в случае обеих клеточных линий. Модификация дополнительными терапевтическими молекулами резко усиливает цитотоксичность полученных конъюгатов (HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE) против клеток глиомы человека в диапазоне не менее 2 – 30 мкМ. Стоит отметить, что пептидсодержащие конъюгаты обладают несколько более высокой токсичностью в отношении клеток U87 по сравнению с соответствующим контролем (смеси HSA + MMAF и HSA + MMAE). По отношению к клеточной линии T98G цитотоксичность этих образцов и соответствующих им смешанных точек не различалась в диапазоне 2 – 30 мкМ. Образец HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁ обладал большей цитотоксичностью в отношении клеток T98G по сравнению с соответствующей смесью HSA + GC против той же линии клеток (рис. 41).

Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) для HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE показана в таблице 1. Она составляла не менее 0,034 мкМ относительно клеток глиомы T98G с коэффициентом корреляции не менее R = 0,88 и не менее 0,97 мкМ относительно клеток глиомы U 87 с коэффициентом корреляции. не менее R = 0,71.

Таблица 5. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) для гомоцистамидов HSA и контроля (смеси HSA+MMAF, HSA+MMAE, HSA+GCB₁₂H₁₁)

Линия клеток	Образец	IC ₅₀	R
T98G	HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -MMAE	0,034	0,99
	HSA + MMAE	0,010	0,99
	HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -MMAF	0,147	0,99
	HSA + MMAF	0,044	0,98
	HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -GCB ₁₂ H ₁₁	0,132	0,97
	HSA + GC	0,018	0,88
U87	HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -MMAE	0,97	0,89
	HSA + MMAE	0,173	0,71
	HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -MMAF	1,16	0,96
	HSA + MMAF	1,02	0,80
	HSA-Cy5-HcyCo(B ₉ C ₂ H ₁₁) ₂ -GCB ₁₂ H ₁₁	6,52	0,97
	HSA + GC	0,29	0,99

Данные конструкции содержат большее количество атомов бора, чем описанная выше конструкция HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁, и, как мы видим, цитотоксичность этих трёх конструкций относительно клеток глиомы гораздо выше, чем у HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁. На основании этих результатов мы ожидаем, что конструкции HSA-Cy5-Hcy

Co(B₉C₂H₁₁)₂-GCB₁₂H₁₁, HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF и HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE будут, при облучении эпитеpmальными нейтронами, обладать большими значениями цитотоксичности в отношении клеток глиомы уже при меньших дозах, чем в случае HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁. Эта работа предполагается нами в дальнейшем.

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 аминокетам 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 (монометилауристатина, конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE и конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF) и ингибитор нуклеинового обмена гемцитабин, функционализированный по экзоциклической аминокетаме *к*лозо-додекаборатом, (конъюгат HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁);
 - (в) расщепляемого линкера; (в случае конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE и HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF благодаря инициированию реакции с катепсином, уровень которого повышен в раковых клетках, или в случае конъюгата HSA-Cy7-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁ за счет pH лабильной связи);
 - (г) визуализирующего блока (флуорофор Cy5/Cy7 для оптической томографии/контрастный агент для ¹⁹F МРТ).
- 4) Осуществлена оценка противоопухолевой активности борсодержащих мультифункциональных наноконструкций *in vitro* с использованием МТТ-теста.

Обнаружен, что конъюгат HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAE обладает большей противоопухолевой активностью по сравнению с конъюгатом HSA-Cy5-HcyCo(B₉C₂H₁₁)₂-MMAF. IC₅₀ разработанных конъюгатов составила не менее 0,034 мкМ по отношению к клеткам глиомы T98G с коэффициентом корреляции не менее R = 0,88.

При обработке клеток линии T98G конъюгатом HSA-Cy5-HcyTFAc-GCB₁₂H₁₁, 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 T98G, предварительно обработанных конъюгатом HSA-Cy5-Hcy-TFAc-GCB₁₂H₁₁ в концентрации при которой конъюгат не проявляет цитотоксичности, снижается после проведения БНЗТ. Данные сопоставимы с таковыми при инкубации клеток с ¹⁰B-борфенилаланином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hyman A.A., Salser S., Drechsel D.N., Unwin N., Mitchison T.J. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: Information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP // *Molecular Biology of the Cell*. 1992. № 10(3). С. 1155–1167.
DOI:10.1091/mbc.3.10.1155.
2. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. // *Nature*. 1984. № 5991(312). С. 237–242. DOI:10.1038/312237A0.
3. Stec-Martyna E., Ponassi M., Miele M., Parodi S., Felli L., Rosano C. Structural Comparison of the Interaction of Tubulin with Various Ligands Affecting Microtubule Dynamics // *Current Cancer Drug Targets*. 2012. № 6(12). С. 658–666.
DOI:10.2174/156800912801784893.
4. Waight A.B., Bargsten K., Doronina S., Steinmetz M.O., Sussman D., Prota A.E. Structural basis of microtubule destabilization by potent auristatin anti-mitotics // *PLoS ONE*. 2016. № 8(11). DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0160890.
5. Peters C., Brown S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics // *Bioscience reports*. 2015. № 4(35). DOI:10.1042/BSR20150089.
6. Stanton R.A., Gernert K.M., Nettles J.H., Aneja R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective // *Medicinal Research Reviews*. 2011. № 3(31). С. 443–481. DOI:10.1002/MED.20242.
7. Kumar A., White J., James Christie R., Dimasi N., Gao C. Antibody-Drug Conjugates // *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2017. (50). С. 441–480.
DOI:10.1016/BS.ARM.C.2017.08.002.
8. Maderna A., Leverett C.A. Recent advances in the development of new auristatins: Structural modifications and application in antibody drug conjugates // *Molecular Pharmaceutics*. 2015. № 6(12). С. 1798–1812.
DOI:10.1021/MP500762U/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MP-2014-00762U_0026.GIF.
9. Doronina S.O., Toki B.E., Torgov M.Y., Mendelsohn B.A., Cervený C.G., Chace D.F., DeBlanc R.L., Gearing R.P., Bovee T.D., Siegall C.B., Francisco J.A., Wahl A.F., Meyer D.L., Senter P.D. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for

- cancer therapy // *Nature Biotechnology* 2003 21:7. 2003. № 7(21). C. 778–784.
DOI:10.1038/nbt832.
10. Data R.U.S.A. US6884869 - SG MMAE synthesis2005. № 12(2).
 11. Chia C.S.B., Chemmedchem J. A Patent Review on FDA-Approved Antibody-Drug Conjugates, Their Linkers and Drug Payloads // *ChemMedChem*. 2022. № 11(17). C. e202200032. DOI:10.1002/CMDC.202200032.
 12. Doronina S.O., Mendelsohn B.A., Bovee T.D., Cervený C.G., Alley S.C., Meyer D.L., Oflazoglu E., Toki B.E., Sanderson R.J., Zabinski R.F., Wahl A.F., Senter P.D. Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: Effects of linker technology on efficacy and toxicity // *Bioconjugate Chemistry*. 2006. № 1(17). C. 114–124. DOI:10.1021/BC0502917/SUPPL_FILE/BC0502917SI20051019_033507.PDF.
 13. Law I.C., Us W.A., Scholler N., Us W.A. (12) United States Patent2010. № 12(2).
 14. Bajjuri K.M., Liu Y., Liu C., Sinha S.C. The legumain protease-activated auristatin prodrugs suppress tumor growth and metastasis without toxicity // *ChemMedChem*. 2011. № 1(6). C. 54–59. DOI:10.1002/CMDC.201000478.
 15. Pes L., Koester S.D., Magnusson J.P., Chercheja S., Medda F., Abu Ajaj K., Rognan D., Daum S., Nollmann F.I., Garcia Fernandez J., Perez Galan P., Walter H.K., Warnecke A., Kratz F. Novel auristatin E-based albumin-binding prodrugs with superior anticancer efficacy in vivo compared to the parent compound // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2019. (296). C. 81–92.
DOI:10.1016/J.JCONREL.2019.01.010.
 16. Dinesen A., Winther A., Wall A., Märcher A., Palmfeldt J., Chudasama V., Wengel J., Gothelf K. V., Baker J.R., Howard K.A. Albumin Biomolecular Drug Designs Stabilized through Improved Thiol Conjugation and a Modular Locked Nucleic Acid Functionalized Assembly // *Bioconjugate Chemistry*. 2022. № 2(33). C. 333–342.
DOI:10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.1C00561/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BC1C00561_0011.GIF.
 17. Batisse C., Dransart E., Ait Sarkouh R., Brulle L., Bai S.K., Godefroy S., Johannes L., Schmidt F. A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy //

- European journal of medicinal chemistry. 2015. (95). C. 483–491.
DOI:10.1016/J.EJMECH.2015.03.047.
18. Ohri R., Bhakta S., Fourie-O'Donohue A., Dela Cruz-Chuh J., Tsai S.P., Cook R., Wei B., Ng C., Wong A.W., Bos A.B., Farahi F., Bhakta J., Pillow T.H., Raab H., Vandlen R., Polakis P., Liu Y., Erickson H., Junutula J.R., Kozak K.R. High-Throughput Cysteine Scanning To Identify Stable Antibody Conjugation Sites for Maleimide- and Disulfide-Based Linkers // *Bioconjugate chemistry*. 2018. № 2(29). C. 473–485.
DOI:10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.7B00791.
 19. Ashman N., Bargh J.D., Walsh S.J., Greenwood R.D., Tiberghien A., Carroll J.S., Spring D.R. Peroxide-cleavable linkers for antibody–drug conjugates // *Chemical Communications*. 2023. № 13(59). C. 1841–1844. DOI:10.1039/D2CC06677G.
 20. Francisco J.A., Cervený C.G., Meyer D.L., Mixan B.J., Klussman K., Chace D.F., Rejniak S.X., Gordon K.A., DeBlanc R., Toki B.E., Law C.L., Doronina S.O., Siegall C.B., Senter P.D., Wahl A.F. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity // *Blood*. 2003. № 4(102). C. 1458–1465.
DOI:10.1182/BLOOD-2003-01-0039.
 21. Joubert N., Beck A., Dumontet C., Denevault-Sabourin C. Antibody–Drug Conjugates: The Last Decade // *Pharmaceuticals 2020*, Vol. 13, Page 245. 2020. № 9(13). C. 245.
DOI:10.3390/PH13090245.
 22. Junutula J.R., Raab H., Clark S., Bhakta S., Leipold D.D., Weir S., Chen Y., Simpson M., Tsai S.P., Dennis M.S., Lu Y., Meng Y.G., Ng C., Yang J., Lee C.C., Duenas E., Gorrell J., Katta V., Kim A., McDorman K., Flagella K., Venook R., Ross S., Spencer S.D., Lee Wong W., Lowman H.B., Vandlen R., Sliwkowski M.X., Scheller R.H., Polakis P., Mallet W. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index // *Nature Biotechnology* 2008 26:8. 2008. № 8(26). C. 925–932.
DOI:10.1038/nbt.1480.
 23. Liu J., Burris H., Wang J.S., Barroilhet L., Gutierrez M., Wang Y., Vaze A., Commerford R., Royer-Joo S., Choerung V., Humke E., Moore K. An open-label phase I dose-escalation study of the safety and pharmacokinetics of DMUC4064A in patients with platinum-resistant ovarian cancer // *Gynecologic Oncology*. 2021. № 3(163). C. 473–480.
DOI:10.1016/j.ygyno.2021.09.023.

24. Hu X. yue, Wang R., Jin J., Liu X. jun, Cui A. long, Sun L. qi, Li Y. ping, Li Y., Wang Y. cheng, Zhen Y. su, Miao Q. fang, Li Z. rong. An EGFR-targeting antibody-drug conjugate LR004-VC-MMAE: potential in esophageal squamous cell carcinoma and other malignancies // *Molecular oncology*. 2019. № 2(13). C. 246–263. DOI:10.1002/1878-0261.12400.
25. Sun M.M.C., Beam K.S., Cerveny C.G., Hamblett K.J., Blackmore R.S., Torgov M.Y., Handley F.G.M., Ihle N.C., Senter P.D., Alley S.C. Reduction-alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody disulfides // *Bioconjugate chemistry*. 2005. № 5(16). C. 1282–1290. DOI:10.1021/BC050201Y.
26. Gébleux R., Stringhini M., Casanova R., Soltermann A., Neri D. Non-internalizing antibody-drug conjugates display potent anti-cancer activity upon proteolytic release of monomethyl auristatin E in the subendothelial extracellular matrix // *International journal of cancer*. 2017. № 7(140). C. 1670–1679. DOI:10.1002/IJC.30569.
27. Xu L., Packer L.E., Qian M.G., Wu J.T. Rapid quantification of a cleavable antibody-conjugated drug by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with microwave-assisted enzymatic cleavage // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016. (128). C. 226–235. DOI:10.1016/J.JPBA.2016.05.043.
28. Leong S.R., Liang W.C., Wu Y., Crocker L., Cheng E., Sampath D., Ohri R., Raab H., Hass P.E., Pham T., Firestein R., Li D., Schutten M., Stagg N.J., Ogasawara A., Koppada N., Roth L., Williams S.P., Lee B.C., Chalouni C., Peng I., Devoss J., Tremayne J., Polakis P., Polson A.G. An anti-B7-H4 antibody-drug conjugate for the treatment of breast cancer // *Molecular pharmaceuticals*. 2015. № 6(12). C. 1717–1729. DOI:10.1021/MP5007745.
29. McDonagh C.F., Turcott E., Westendorf L., Webster J.B., Alley S.C., Kim K., Andreyka J., Stone I., Hamblett K.J., Francisco J.A., Carter P. Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment // *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2006. № 7(19). C. 299–307. DOI:10.1093/PROTEIN/GZL013.
30. Sanderson R.J., Hering M.A., James S.F., Sun M.M.C., Doronina S.O., Siadak A.W., Senter P.D., Wahl A.F. In vivo Drug-Linker Stability of an Anti-CD30 Dipeptide-Linked Auristatin Immunoconjugate // *Clinical Cancer Research*. 2005. № 2(11). C. 843–852. DOI:10.1158/1078-0432.843.11.2.

31. Liu X., Mohanty R.P., Maier E.Y., Peng X., Wulfe S., Looney A.P., Aung K.L., Ghosh D. Controlled loading of albumin-drug conjugates ex vivo for enhanced drug delivery and antitumor efficacy // *Journal of Controlled Release*. 2020. (328). C. 1–12.
DOI:10.1016/J.JCONREL.2020.08.015.
32. Chung S.W., Cho Y.S., Choi J.U., Kim H.R., Won T.H., Kim S.Y., Byun Y. Highly potent monomethyl auristatin E prodrug activated by caspase-3 for the chemoradiotherapy of triple-negative breast cancer // *Biomaterials*. 2019. (192). C. 109–117.
DOI:10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.11.001.
33. Zhou W., Fang P., Yu D., Ren H., You M., Yin L., Mei F., Zhu H., Wang Z., Xu H., Cao Y., Sun X., Xu X., Bi J., Wang J., Ma L., Wang X., Chen L., Zhang Y., Cen X., Zhu X., Lou L., Liu D., Tan X., Yang J., Meng T., Shen J. Preclinical Evaluation of 9MW2821, a Site-Specific Monomethyl Auristatin E-based Antibody-Drug Conjugate for treatment of Nectin-4-expressing Cancers // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2023. № 8(22).
DOI:10.1158/1535-7163.MCT-22-0743.
34. Juen L., Baltus C.B., Gély C., Feuillâtre O., Desgranges A., Viaud-Massuard M.C., Martin C. Innovative Bioconjugation Technology for Antibody-Drug Conjugates: Proof of Concept in a CD30-Positive Lymphoma Mouse Model // *Bioconjugate chemistry*. 2021. № 3(32). C. 595–606. DOI:10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.1C00058.
35. Juen L., Baltus C.B., Gély C., Kervarrec T., Feuillâtre O., Desgranges A., Viaud-Massuard M.C., Martin C. Therapeutic Potential of MF-TTZ-MMAE, a Site-Specifically Conjugated Antibody-Drug Conjugate, for the Treatment of HER2-Overexpressing Breast Cancer // *Bioconjugate chemistry*. 2022. № 2(33). C. 418–426.
DOI:10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.2C00015.
36. Badescu G., Bryant P., Bird M., Henseleit K., Swierkosz J., Parekh V., Tommasi R., Pawlisz E., Jurlewicz K., Farys M., Camper N., Sheng X., Fisher M., Grygorash R., Kyle A., Abhilash A., Frigerio M., Edwards J., Godwin A. Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates // *Bioconjugate chemistry*. 2014. № 6(25). C. 1124–1136. DOI:10.1021/BC500148X.
37. Bryant P., Pabst M., Badescu G., Bird M., McDowell W., Jamieson E., Swierkosz J., Jurlewicz K., Tommasi R., Henseleit K., Sheng X., Camper N., Manin A., Kozakowska K., Peciak K., Laurine E., Grygorash R., Kyle A., Morris D., Parekh V., Abhilash A.,

- Choi J.W., Edwards J., Frigerio M., Baker M.P., Godwin A. In Vitro and In Vivo Evaluation of Cysteine Rebridged Trastuzumab-MMAE Antibody Drug Conjugates with Defined Drug-to-Antibody Ratios // *Molecular pharmaceutics*. 2015. № 6(12). C. 1872–1879. DOI:10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.5B00116.
38. Mao Y., Wei D., Fu F., Wang H., Sun Z., Huang Z., Wang Y., Zhang G., Zhang X., Jiang B., Chen H. Development of a MMAE-based antibody-drug conjugate targeting B7–H3 for glioblastoma // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023. (257). C. 115489. DOI:10.1016/J.EJMECH.2023.115489.
39. Wei D., Jiang Y., Mao Y., Xu Z., Chen J., Gao X., Li J., Jiang B., Chen H. Phenyldivinylsulfonamides for the construction of antibody-drug conjugates with controlled four payloads // *Bioorganic chemistry*. 2023. (134). DOI:10.1016/J.BIOORG.2023.106463.
40. Javaid F., Pilotti C., Camilli C., Kallenberg D., Bahou C., Blackburn J., R. Baker J., Greenwood J., Moss S.E., Chudasama V. Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (LRG1) as a novel ADC target // *RSC chemical biology*. 2021. № 4(2). C. 1206–1220. DOI:10.1039/D1CB00104C.
41. Greene M.K., Chen T., Robinson E., Straubinger N.L., Minx C., Chan D.K.W., Wang J., Burrows J.F., Van Schaeybroeck S., Baker J.R., Caddick S., Longley D.B., Mager D.E., Straubinger R.M., Chudasama V., Scott C.J. Controlled coupling of an ultrapotent auristatin warhead to cetuximab yields a next-generation antibody-drug conjugate for EGFR-targeted therapy of KRAS mutant pancreatic cancer // *British Journal of Cancer* 2020 123:10. 2020. № 10(123). C. 1502–1512. DOI:10.1038/s41416-020-01046-6.
42. Mohamed Amar I.A., Huvelle S., Douez E., Letast S., Henrion S., Viaud-Massuard M.C., Aubrey N., Allard-Vannier E., Joubert N., Denevault-Sabourin C. Dual intra- and extracellular release of monomethyl auristatin E from a neutrophil elastase-sensitive antibody-drug conjugate // *European journal of medicinal chemistry*. 2022. (229). DOI:10.1016/J.EJMECH.2021.114063.
43. Burke P.J., Hamilton J.Z., Jeffrey S.C., Hunter J.H., Doronina S.O., Okeley N.M., Miyamoto J.B., Anderson M.E., Stone I.J., Ulrich M.L., Simmons J.K., McKinney E.E., Senter P.D., Lyon R.P. Optimization of a PEGylated glucuronide-monomethylauristatin E linker for antibody-drug conjugates // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017. № 1(16). C.

- 116–123. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-16-0343/87141/AM/OPTIMIZATION-OF-A-PEGYLATED-GLUCURONIDE.
44. Renoux B., Fangous L., Hötten C., Péraudeau E., Eddhif B., Poinot P., Clarhaut J., Papot S. A β -glucuronidase-responsive albumin-binding prodrug programmed for the double release of monomethyl auristatin E // *MedChemComm*. 2018. № 12(9). C. 2068–2071. DOI:10.1039/C8MD00466H.
 45. Shin S.H., Park Y.H., Park S.S., Ju E.J., Park J., Ko E.J., Bae D.J., Kim S.Y., Chung C.W., Song H.Y., Jang S.J., Jeong S.Y., Song S.Y., Choi E.K. An Elaborate New Linker System Significantly Enhances the Efficacy of an HER2-Antibody-Drug Conjugate against Refractory HER2-Positive Cancers // *Advanced science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany). 2021. № 23(8). DOI:10.1002/ADVS.202102414.
 46. Châtre R., Blochouse E., Eid R., Djago F., Lange J., Tarighi M., Renoux B., Sobilo J., Le Pape A., Clarhaut J., Geffroy C., Opalinski I., Tuo W., Papot S., Poinot P. Induced-volatolomics for the design of tumour activated therapy // *Chemical Science*. 2023. № 18(14). C. 4697–4703. DOI:10.1039/D2SC06797H.
 47. Clardy S.M., Yurkovetskiy A., Yin M., Gumerov D., Xu L., Ter-Ovanesyan E., Bu C., Johnson A., Protopopova M., Zhang Q., Bodyak N., Damelin M., Lee D.H., Bergstrom D., Lowinger T.B. Abstract 754: Unique pharmacologic properties of Dolaflexin-based ADCs—a controlled bystander effect // *Cancer Research*. 2018. № 13_Supplement(78). C. 754–754. DOI:10.1158/1538-7445.AM2018-754.
 48. Yurkovetskiy A. V., Bodyak N.D., Yin M., Thomas J.D., Clardy S.M., Conlon P.R., Stevenson C.A., Uttard A., Qin L.L., Gumerov D.R., Ter-Ovanesyan E., Bu C., Johnson A.J., Gurijala V.R., McGillicuddy D., DeVit M.J., Poling L.L., Protopopova M., Xu L., Zhang Q., Park P.U., Bergstrom D.A., Lowinger T.B. Dolaflexin: A Novel Antibody-Drug Conjugate Platform Featuring High Drug Loading and a Controlled Bystander Effect // *Molecular cancer therapeutics*. 2021. № 5(20). C. 885–895. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-20-0166.
 49. Quintana J.M., Arboleda D., Hu H., Scott E., Luthria G., Pai S., Parangi S., Weissleder R., Miller M.A. Radiation Cleaved Drug-Conjugate Linkers Enable Local Payload Release // *Bioconjugate Chemistry*. 2022. № 8(33). C. 1474–1484.

DOI:10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.2C00174/ASSET/IMAGES/LARGE/BC2C00174_0007.JPEG.

50. Hamann P.R., Hinman L.M., Hollander I., Beyer C.F., Lindh D., Holcomb R., Hallett W., Tsou H.R., Upešlaciš J., Shochat D., Mountain A., Flowers D.A., Bernstein I. Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia // *Bioconjugate chemistry*. 2002. № 1(13). C. 47–58. DOI:10.1021/BC010021Y.
51. Austin C.D., Wen X., Gazzard L., Nelson C., Scheller R.H., Scales S.J. Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody-drug conjugates // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. № 50(102). C. 17987–17992. DOI:10.1073/PNAS.0509035102/SUPPL_FILE/09035FIG8.JPG.
52. Koester S.D., Pes L., Magnusson J.P., Chercheja S., Medda F., Nollmann F.I., Galan P.P., Fernandez J.G., Walter H.-K., Ajaj K.A., Warnecke A., Kratz F. Abstract 3703: Superior efficacy of novel albumin-binding auristatin E-based prodrugs compared to auristatin E in a panel of human xenograft models in mice // *Cancer Research*. 2018. № 13_Supplement(78). C. 3703–3703. DOI:10.1158/1538-7445.AM2018-3703.
53. Kostova V., Désos P., Starck J.B., Kotschy A. *The Chemistry Behind ADCs // Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland). 2021. № 5(14). DOI:10.3390/PH14050442.
54. Markham A. Tisotumab Vedotin: First Approval // *Drugs*. 2021. № 18(81). C. 2141–2147. DOI:10.1007/S40265-021-01633-8/METRICS.
55. Yonemori K., Kuboki Y., Hasegawa K., Iwata T., Kato H., Takehara K., Hirashima Y., Kato H., Passey C., Buchbjerg J.K., Harris J.R., Andreassen C.M., Nicacio L., Soumaoro I., Fujiwara K. Tisotumab vedotin in Japanese patients with recurrent/metastatic cervical cancer: Results from the innovaTV 206 study // *Cancer science*. 2022. № 8(113). C. 2788–2797. DOI:10.1111/CAS.15443.
56. Lorusso D., Vergote I., O’Cearbhaill R.E., Westermann A.M., Banerjee S.N., Nieuwenhuysen E. Van, Iglesias D.A., Collins D.C., Cibula D., Madsen K., Tewari K.S., Pignata S., Baurain J.-F., Boere I.A., denys H., Andreassen C.M., Soumaoro I., Jain S., Gennigens C.N., Monk B.J. Tisotumab vedotin (TV) + pembrolizumab (pembro) in first-

- line (1L) recurrent or metastatic cervical cancer (r/mCC): Interim results of ENGOT Cx8/GOG 3024/innovaTV 205. // https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.5507. 2022. № 16_suppl(40). C. 5507–5507. DOI:10.1200/JCO.2022.40.16_SUPPL.5507.
57. de Bono J.S., Concin N., Hong D.S., Thistlethwaite F.C., Machiels J.P., Arkenau H.T., Plummer R., Jones R.H., Nielsen D., Windfeld K., Ghatta S., Slomovitz B.M., Spicer J.F., Yachnin J., Ang J.E., Mau-Sørensen P.M., Forster M.D., Collins D., Dean E., Rangwala R.A., Lassen U. Tisotumab vedotin in patients with advanced or metastatic solid tumours (InnovaTV 201): a first-in-human, multicentre, phase 1-2 trial // *The Lancet. Oncology*. 2019. № 3(20). C. 383–393. DOI:10.1016/S1470-2045(18)30859-3.
58. Wiggins B., Liu-Shin L., Yamaguchi H., Ratnaswamy G. Characterization of cysteine-linked conjugation profiles of immunoglobulin G1 and immunoglobulin G2 antibody-drug conjugates // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2015. № 4(104). C. 1362–1372. DOI:10.1002/JPS.24338.
59. Pan L.Y., Salas-Solano O., Valliere-Douglass J.F. Conformation and dynamics of interchain cysteine-linked antibody-drug conjugates as revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry // *Analytical chemistry*. 2014. № 5(86). C. 2657–2664. DOI:10.1021/AC404003Q.
60. Beckley N.S., Lazzareschi K.P., Chih H.W., Sharma V.K., Flores H.L. Investigation into temperature-induced aggregation of an antibody drug conjugate // *Bioconjugate chemistry*. 2013. № 10(24). C. 1674–1683. DOI:10.1021/BC400182X.
61. Chen J., Yin S., Wu Y., Ouyang J. Development of a native nanoelectrospray mass spectrometry method for determination of the drug-to-antibody ratio of antibody-drug conjugates // *Analytical chemistry*. 2013. № 3(85). C. 1699–1704. DOI:10.1021/AC302959P.
62. Hamblett K.J., Senter P.D., Chace D.F., Sun M.M.C., Lenox J., Cervený C.G., Kissler K.M., Bernhardt S.X., Kopcha A.K., Zabinski R.F., Meyer D.L., Francisco J.A. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004. № 20(10). C. 7063–7070. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-04-0789.

63. Hu H., Ng T.S.C., Kang M., Scott E., Li R., Quintana J.M., Matvey D., Vantaku V.R., Weissleder R., Parangi S., Miller M.A. Thyroid Cancers Exhibit Oncogene-Enhanced Macropinocytosis that Is Restrained by IGF1R and Promote Albumin-Drug Conjugate Response // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2023. № 17(29). C. 3457–3470. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-22-2976.
64. Temming K., Meyer D.L., Zabinski R., Dijkers E.C.F., Poelstra K., Molema G., Kok R.J. Evaluation of RGD-Targeted Albumin Carriers for Specific Delivery of Auristatin E to Tumor Blood Vessels // *Bioconjugate Chemistry*. 2006. № 6(17). C. 1385–1394. DOI:10.1021/BC060087Z.
65. Yin W., Xu T., Ding H., Zhang J., Bodenko V., Tretyakova M.S., Belousov M. V., Liu Y., Oroujeni M., Orlova A., Tolmachev V., Gräslund T., Vorobyeva A. Comparison of HER2-targeted affibody conjugates loaded with auristatin- and maytansine-derived drugs // *Journal of Controlled Release*. 2023. (355). C. 515–527. DOI:10.1016/J.JCONREL.2023.02.005.
66. Temming K., Meyer D.L., Zabinski R., Senter P.D., Poelstra K., Molema G., Kok R.J. Improved efficacy of alphavbeta3-targeted albumin conjugates by conjugation of a novel auristatin derivative // *Molecular pharmaceutics*. 2007. № 5(4). C. 686–694. DOI:10.1021/MP0700312.
67. Nunes J.P.M., Morais M., Vassileva V., Robinson E., Rajkumar V.S., Smith M.E.B., Pedley R.B., Caddick S., Baker J.R., Chudasama V. Functional native disulfide bridging enables delivery of a potent, stable and targeted antibody-drug conjugate (ADC) // *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2015. № 53(51). C. 10624–10627. DOI:10.1039/C5CC03557K.
68. Renoux B., Raes F., Legigan T., Péraudeau E., Eddhif B., Poinot P., Tranoy-Opalinski I., Alsarraf J., Koniev O., Kolodych S., Lerondel S., Le Pape A., Clarhaut J., Papot S. Targeting the tumour microenvironment with an enzyme-responsive drug delivery system for the efficient therapy of breast and pancreatic cancers // *Chemical Science*. 2017. № 5(8). C. 3427–3433. DOI:10.1039/C7SC00472A.
69. Lee B. ill, Park M.H., Byeon J.J., Shin S.H., Choi J., Park Y., Park Y.H., Chae J., Shin Y.G. Quantification of an Antibody-Conjugated Drug in Fat Plasma by an Affinity

- Capture LC-MS/MS Method for a Novel Prenyl Transferase-Mediated Site-Specific Antibody-Drug Conjugate // *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020. № 7(25). DOI:10.3390/MOLECULES25071515.
70. Study Details | Phase 1 Study of FS-1502 in Patients With HER2 Expressed Advanced Solid Tumors and Breast Cancer. | *ClinicalTrials.gov* [Электронный ресурс]. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03944499> (дата обращения: 27.03.2024).
71. FDA lifts partial clinical hold on Mersana’s Phase I study of XMT-1522 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.clinicaltrialsarena.com/news/fda-lifts-partial-clinical-hold-mersanas-phase-i-study-xmt-1522/> (дата обращения: 27.03.2024).
72. Fu Q., Li H., Duan D., Wang C., Shen S., Ma H., Liu Z. External-Radiation-Induced Local Hydroxylation Enables Remote Release of Functional Molecules in Tumors // *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2020. № 48(59). С. 21546–21552. DOI:10.1002/ANIE.202005612.
73. Oflazoglu E., Stone I.J., Gordon K., Wood C.G., Repasky E.A., Grewal I.S., Law C.L., Gerber H.P. Potent anticarcinoma activity of the humanized anti-CD70 antibody h1F6 conjugated to the tubulin inhibitor auristatin via an uncleavable linker // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008. № 19(14). С. 6171–6180. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-08-0916.
74. Sijbrandi N.J., Merkul E., Muns J.A., Waalboer D.C.J., Adamzek K., Bolijn M., Montserrat V., Somsen G.W., Haselberg R., Steverink P.J.G.M., Houthoff H.J., Van Dongen G.A.M.S. A novel platinum(II)-based bifunctional ADC linker benchmarked using ⁸⁹Zr-Desferal and auristatin F-conjugated trastuzumab // *Cancer Research*. 2017. № 2(77). С. 257–267. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-1900/652620/AM/A-NOVEL-PLATINUM-II-BASED-BIFUNCTIONAL-ADC-LINKER.
75. Behrens C.R., Ha E.H., Chinn L.L., Bowers S., Probst G., Fitch-Bruhns M., Monteon J., Valdiosera A., Bermudez A., Liao-Chan S., Wong T., Melnick J., Theunissen J.W., Flory M.R., Houser D., Venstrom K., Levashova Z., Sauer P., Migone T.S., Van Der Horst E.H., Halcomb R.L., Jackson D.Y. Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Derived from Interchain Cysteine Cross-Linking Demonstrate Improved Homogeneity and Other Pharmacological Properties over Conventional Heterogeneous ADCs // *Molecular*

- pharmaceutics. 2015. № 11(12). C. 3986–3998.
DOI:10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.5B00432.
76. Huang R., Sheng Y., Wei D., Lu W., Xu Z., Chen H., Jiang B. Divinylsulfonamides enable the construction of homogeneous antibody-drug conjugates // *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2020. № 23(28). DOI:10.1016/J.BMC.2020.115793.
77. Minnix M., Li L., Yazaki P., Chea J., Poku E., Colcher D., Shively J.E. Improved targeting of an anti-TAG-72 antibody drug conjugate for the treatment of ovarian cancer // *Cancer medicine*. 2020. № 13(9). C. 4756–4767. DOI:10.1002/CAM4.3078.
78. Skidmore L., Sakamuri S., Knudsen N.A., Hewet A.G., Milutinovic S., Barkho W., Biroc S.L., Kirtley J., Marsden R., Storey K., Lopez I., Yu W., Fang S.Y., Yao S., Gu Y., Tian F. ARX788, a site-specific anti-HER2 antibody–drug conjugate, demonstrates potent and selective activity in HER2-low and T-DM1–resistant breast and gastric cancers // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2020. № 9(19). C. 1833–1843. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-19-1004/177224/AM/ARX788-A-SITE-SPECIFIC-ANTI-HER2-ANTIBODY-DRUG.
79. Study Details | A Dose-escalation Study of ARX788, IV Administered in Subjects With Advanced Cancers With HER2 Expression | [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/study/NCT02512237) [Электронный ресурс]. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02512237> (дата обращения: 26.03.2024).
80. Study Details | A Dose-escalation, Expansion Study of ARX788, in Advanced Solid Tumors Subjects With HER2 Expression (ACE-Pan Tumor 01) | [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/study/NCT03255070) [Электронный ресурс]. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03255070> (дата обращения: 26.03.2024).
81. Zhang C., Welborn M., Zhu T., Yang N.J., Santos M.S., Van Voorhis T., Pentelute B.L. П-Clamp-mediated cysteine conjugation // *Nature chemistry*. 2016. № 2(8). C. 120–128. DOI:10.1038/NCHEM.2413.
82. Zimmerman E.S., Heibeck T.H., Gill A., Li X., Murray C.J., Madlansacay M.R., Tran C., Uter N.T., Yin G., Rivers P.J., Yam A.Y., Wang W.D., Steiner A.R., Bajad S.U., Penta K., Yang W., Hallam T.J., Thanos C.D., Sato A.K. Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system // *Bioconjugate chemistry*. 2014. № 2(25). C. 351–361. DOI:10.1021/BC400490Z.

83. Merkul E., Sijbrandi N.J., Aydin I., Muns J.A., Peters R.J.R.W., Laarhoven P., Houthoff H.J., Van Dongen G.A.M.S. A successful search for new, efficient, and silver-free manufacturing processes for key platinum(II) intermediates applied in antibody–drug conjugate (ADC) production // *Green Chemistry*. 2020. № 7(22). C. 2203–2212. DOI:10.1039/C9GC03130H.
84. Cilliers C., Guo H., Liao J., Christodolu N., Thurber G.M. Multiscale Modeling of Antibody-Drug Conjugates: Connecting Tissue and Cellular Distribution to Whole Animal Pharmacokinetics and Potential Implications for Efficacy // *The AAPS journal*. 2016. № 5(18). C. 1117–1130. DOI:10.1208/S12248-016-9940-Z.
85. Xenaki K.T., Dorrestijn B., Muns J.A., Adamzek K., Doukeridou S., Houthoff H.J., Oliveira S., van Bergen en Henegouwen P.M.P. Homogeneous tumor targeting with a single dose of HER2-targeted albumin-binding domain-fused nanobody-drug conjugates results in long-lasting tumor remission in mice // *Theranostics*. 2021. № 11(11). C. 5525–5538. DOI:10.7150/THNO.57510.
86. Albone E.F., Spidel J.L., Cheng X., Park Y.C., Jacob S., Milinichik A.Z., Vaessen B., Butler J., Kline J.B., Grasso L. Generation of therapeutic immunoconjugates via Residue-Specific Conjugation Technology (RESPECT) utilizing a native cysteine in the light chain framework of *Oryctolagus cuniculus* // *Cancer biology & therapy*. 2017. № 5(18). C. 347–357. DOI:10.1080/15384047.2017.1312232.
87. Merkul E., Muns J.A., Sijbrandi N.J., Houthoff H.J., Nijmeijer B., van Rheenen G., Reedijk J., van Dongen G.A.M.S. An Efficient Conjugation Approach for Coupling Drugs to Native Antibodies via the PtII Linker Lx for Improved Manufacturability of Antibody–Drug Conjugates // *Angewandte Chemie International Edition*. 2021. № 6(60). C. 3008–3015. DOI:10.1002/ANIE.202011593.
88. Locher G.L. the American Journal of Roentgen Ology and Radium Therapy Biological Effects and Therapeutic Possibilities of Neutrons // *Am. J. Roentgenol. Radium Ther.* 1936. (36). C. 1.
89. Sweet W.H. Early history of development of boron neutron capture therapy of tumors // *Z Journal of Neuro-Oncology*. 1997. (33). C. 19–26.

90. Pitto-Barry A. Polymers and boron neutron capture therapy (BNCT): A potent combination. № 14(12)Royal Society of Chemistry, 04.2021.
91. Maliszewska-Olejniczak K., Kaniowski D., Araszkievicz M., Tymińska K., Korgul A. Molecular Mechanisms of Specific Cellular DNA Damage Response and Repair Induced by the Mixed Radiation Field During Boron Neutron Capture Therapy // *Frontiers in Oncology*. 2021. (11). C. 676575. DOI:10.3389/FONC.2021.676575/BIBTEX.
92. Cheng X., Li F., Liang L. Boron Neutron Capture Therapy: Clinical Application and Research Progress // *Current Oncology*. 2022. № 10(29). C. 7868. DOI:10.3390/CURRONCOL29100622.
93. Seneviratne D., Advani P., Trifiletti D.M., Chumsri S., Beltran C.J., Bush A.F., Vallow L.A. Exploring the Biological and Physical Basis of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) as a Promising Treatment Frontier in Breast Cancer // *Cancers*. 2022. № 12(14). DOI:10.3390/CANCERS14123009.
94. Slatkin D.N., Stoner R.D., Rosander K.M., Kalef-Ezrat J.A., Laissuef J.A. Central nervous system radiation syndrome in mice from preferential $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ irradiation of brain vasculature (lethality/endothelium/x-ray/enhancement) // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 1988. (85). C. 4020–4024.
95. Luderer M.J., De La Puente P., Azab A.K. EXPERT REVIEW Advancements in Tumor Targeting Strategies for Boron Neutron Capture Therapy DOI:10.1007/s11095-015-1718-y.
96. Wittig A., Stecher-Rasmussen F., Hilger R.A., Rassow J., Mauri P., Sauerwein W. Sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH), a boron carrier that merits more attention // *Applied Radiation and Isotopes*. 2011. № 12(69). C. 1760–1764. DOI:10.1016/J.APRADISO.2011.02.046.
97. Soloway A.H., Hatanaka H., Davis M.A. Penetration of Brain and Brain Tumor. V II. Tumor-Binding Sulfhydryl Boron Compounds // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1967. № 4(10). C. 714–717. DOI:10.1021/jm00316a042.
98. Therapy A.R.B.C. Original Investigations A Revised Boron-Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors // *Most*. 1975. (94). C. 81–94.

99. Boado R.J., Li J.Y., Tsukamoto H., Pardridge W.M. Hypoxia induces de-stabilization of the LAT1 large neutral amino acid transporter mRNA in brain capillary endothelial cells // *Journal of Neurochemistry*. 2003. № 4(85). C. 1037–1042. DOI:10.1046/J.1471-4159.2003.01757.X.
100. Ohnishi K., Misawa M., Sikano N., Nakai K., Suzuki M. Enhancement of Cancer Cell-Killing Effects of Boron Neutron Capture Therapy by Manipulating the Expression of L-Type Amino Acid Transporter 1 // *Radiation research*. 2021. № 1(196). C. 17–22. DOI:10.1667/RADE-20-00214.1.
101. Graw M., Book H., York N., Pangan P., Pangan P.A.U., Saito S., Teknik P.B., Jakarta P., Packageengineering B., Graw M., Book H., Pangan P., Pangan P.A.U. 1 (x) L x2013. № Scheme 2. C. 2–3.
102. Hu K., Yang Z., Zhang L., Xie L., Wang L., Xu H., Josephson L., Liang S.H., Zhang M.R. Boron agents for neutron capture therapy // *Coordination Chemistry Reviews*. 2020. (405). C. 213139. DOI:10.1016/J.CCR.2019.213139.
103. Li J., Shi Y., Zhang Z., Liu H., Lang L., Liu T., Chen X., Liu Z. A Metabolically Stable Boron-Derived Tyrosine Serves as a Theranostic Agent for Positron Emission Tomography Guided Boron Neutron Capture Therapy // *Bioconjugate Chemistry*. 2019. № 11(30). C. 2870–2878. DOI:10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.9B00578/ASSET/IMAGES/LARGE/BC9B00578_0006.JPEG.
104. He T., Musah R.A. Evaluation of the Potential of 2-Amino-3-(1,7-dicarba- closo-dodecaboranyl-1-thio)propanoic acid as a boron neutron capture therapy agent // *ACS Omega*. 2019. № 2(4). C. 3820–3826. DOI:10.1021/ACSOMEGA.8B03407/SUPPL_FILE/AO8B03407_SI_001.PDF.
105. Gruzdev D.A., Telegina A.A., Levit G.L., Krasnov V.P. N-Aminoacyl-3-amino- nido-carboranes as a Group of Boron-Containing Derivatives of Natural Amino Acids // *Journal of Organic Chemistry*. 2022. № 8(87). C. 5437–5441. DOI:10.1021/ACS.JOC.2C00151/ASSET/IMAGES/LARGE/JO2C00151_0006.JPEG.

106. Imperio D., Panza L. Sweet Boron: Boron-Containing Sugar Derivatives as Potential Agents for Boron Neutron Capture Therapy // *Symmetry* 2022, Vol. 14, Page 182. 2022. № 2(14). C. 182. DOI:10.3390/SYM14020182.
107. Imperio D., Del Grosso E., Fallarini S., Lombardi G., Panza L. Anomeric sugar boronic acid analogues as potential agents for boron neutron capture therapy // *Beilstein journal of organic chemistry*. 2019. (15). C. 1355–1359. DOI:10.3762/BJOC.15.135.
108. Imperio D., Muz B., Azab A.K., Fallarini S., Lombardi G., Panza L. A Short and Convenient Synthesis of closo-Dodecaborate Sugar Conjugates // *European Journal of Organic Chemistry*. 2019. № 43(2019). C. 7228–7232. DOI:10.1002/EJOC.201901412.
109. Zelenetskii A.N., Uspenskii S., Zaboronok A., Cherkaev G., Shchegolihin A., Mathis B.J., Selyanin M., Yamamoto T., Matsumura A. Polycomplexes of Hyaluronic Acid and Borates in a Solid State and Solution: Synthesis, Characterization and Perspectives of Application in Boron Neutron Capture Therapy 2018. DOI:10.3390/polym10020181.
110. Uram Ł., Nizioł J., Maj P., Sobich J., Rode W., Ruman T. N(4)-[B-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan)methyl]-2'-deoxycytidine as a potential boron delivery agent with respect to glioblastoma // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017. (95). C. 749–755. DOI:10.1016/J.BIOPHA.2017.08.134.
111. Zharkov D.O., Yudkina A. V, Riesebeck T., Loshchenova P.S., Mostovich E.A., Dianov G.L. Boron-containing nucleosides as tools for boron-neutron capture therapy // *American Journal of Cancer Research*. 2021. № 10(11). C. 4668.
112. Olejniczak A.B., Plešek J., Kříž O., Lesnikowski Z.J. A Nucleoside Conjugate Containing a Metallacarborane Group and Its Incorporation into a DNA Oligonucleotide // *Angewandte Chemie*. 2003. № 46(115). C. 5918–5921. DOI:10.1002/ANGE.200352505.
113. Kaniowski D., Nska K.E.O., Sobczak M., Wojtczak B., Janczak S., Lésnikowski Z.J., Nawrot B. High Boron-loaded DNA-Oligomers as Potential Boron Neutron Capture Therapy and Antisense Oligonucleotide Dual-Action Anticancer Agents // *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 1393. 2017. № 9(22). C. 1393. DOI:10.3390/MOLECULES22091393.

114. Triesscheijn M., Ruevekamp M., Aalders M., Baas P., Stewart F.A. Outcome of mTHPC Mediated Photodynamic Therapy is Primarily Determined by the Vascular Response // *Photochemistry and Photobiology*. 2005. № 5(81). C. 1161–1167. DOI:10.1562/2005-04-04-RA-474.
115. Nishida K., Tojo T., Kondo T., Yuasa M. Evaluation of the correlation between porphyrin accumulation in cancer cells and functional positions for application as a drug carrier // *Scientific Reports* 2021 11:1. 2021. № 1(11). C. 1–10. DOI:10.1038/s41598-021-81725-3.
116. Rosenthal M.A., Kavar B., Hill J.S., Morgan D.J., Nation R.L., Stylli S.S., Bassar R.L., Uren S., Geldard H., Green M.D., Kahl S.B., Kaye A.H. Phase I and Pharmacokinetic Study of Photodynamic Therapy for High-Grade Gliomas Using a Novel Boronated Porphyrin // <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.2.519>. 2016. № 2(19). C. 519–524. DOI:10.1200/JCO.2001.19.2.519.
117. Shi Y., Li J., Zhang Z., Duan D., Zhang Z., Liu H., Liu T., Liu Z. Tracing Boron with Fluorescence and Positron Emission Tomography Imaging of Boronated Porphyrin Nanocomplex for Imaging-Guided Boron Neutron Capture Therapy // *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2018. № 50(10). C. 43387–43395. DOI:10.1021/ACSAMI.8B14682/SUPPL_FILE/AM8B14682_SI_001.PDF.
118. Volovetsky A.B., Sukhov V.S., Balalaeva I. V., Dudenkova V. V., Shilyagina N.Y., Feofanov A. V., Efremenko A. V., Grin M.A., Mironov A.F., Sivaev I.B., Bregadze V.I., Maslennikova A. V. Pharmacokinetics of Chlorin e6-Cobalt Bis(Dicarbollide) Conjugate in Balb/c Mice with Engrafted Carcinoma // *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 2556. 2017. № 12(18). C. 2556. DOI:10.3390/IJMS18122556.
119. Xuan S., Zhao N., Zhou Z., Fronczek F.R., Vicente M.G.H. Synthesis and in Vitro Studies of a Series of Carborane-Containing Boron Dipyrrromethenes (BODIPYs) // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016. № 5(59). C. 2109–2117. DOI:10.1021/ACS.JMEDCHEM.5B01783/SUPPL_FILE/JM5B01783_SI_002.CSV.
120. Miyabe J., Ohgaki R., Saito K., Wei L., Quan L., Jin C., Liu X., Okuda S., Nagamori S., Ohki H., Yoshino K., Inohara H., Kanai Y. Boron delivery for boron neutron capture therapy targeting a cancer-upregulated oligopeptide transporter2019. DOI:10.1016/j.jphs.2019.01.012.

121. Nakase I., Katayama M., Hattori Y., Ishimura M., Inaura S., Fujiwara D., Takatani-Nakase T., Fujii I., Futaki S., Kirihata M. Intracellular target delivery of cell-penetrating peptide-conjugated dodecaborate for boron neutron capture therapy (BNCT) // *Chemical communications* (Cambridge, England). 2019. № 93(55). C. 13955–13958.
DOI:10.1039/C9CC03924D.
122. Worm D.J., Hoppenz P., Els-Heindl S., Kellert M., Kuhnert R., Saretz S., Köbberling J., Riedl B., Hey-Hawkins E., Beck-Sickinger A.G. Selective Neuropeptide y Conjugates with Maximized Carborane Loading as Promising Boron Delivery Agents for Boron Neutron Capture Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. № 5(63). C. 2358–2371.
DOI:10.1021/ACS.JMEDCHEM.9B01136/SUPPL_FILE/JM9B01136_SI_001.PDF.
123. Nomoto T., Inoue Y., Yao Y., Suzuki M., Kanamori K., Takemoto H., Matsui M., Tomoda K., Nishiyama N. Poly(vinyl alcohol) boosting therapeutic potential of p-boronophenylalanine in neutron capture therapy by modulating metabolism // *Science Advances*. 2020. № 4(6).
DOI:10.1126/SCIADV.AAZ1722/SUPPL_FILE/AAZ1722_SM.PDF.
124. Isono A., Tsuji M., Sanada Y., Matsushita A., Masunaga S., Hirayama T., Nagasawa H. Design, Synthesis, and Evaluation of Lipopeptide Conjugates of Mercaptoundecahydrododecaborate for Boron Neutron Capture Therapy // *ChemMedChem*. 2019. № 8(14). C. 823–832. DOI:10.1002/CMDC.201800793.
125. Kakarla A.B., Kong I. In Vitro and In Vivo Cytotoxicity of Boron Nitride Nanotubes: A Systematic Review // *Nanomaterials* 2022, Vol. 12, Page 2069. 2022. № 12(12). C. 2069.
DOI:10.3390/NANO12122069.
126. Nakamura H., Koganei H., Miyoshi T., Sakurai Y., Ono K., Suzuki M. Antitumor effect of boron nitride nanotubes in combination with thermal neutron irradiation on BNCT // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015. № 2(25). C. 172–174.
DOI:10.1016/J.BMCL.2014.12.005.
127. Li W., Xie X., Wu T., Lin H., Luo L., Yang H., Li J., Xin Y., Lin X., Chen Y. Loading Auristatin PE onto boron nitride nanotubes and their effects on the apoptosis of Hep G2 cells // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019. (181). C. 305–314.
DOI:10.1016/J.COLSURFB.2019.05.047.

128. Wang Z., Chen Z., Zhang Z., Li J., Chen K., Liang H., Lv L., Chang Y., Liu S., Yang W., Yang Z., Yuan H., Meng X., Liu T., Wang F., Li J., Xing G. Multifunctional high boron content MOFs nano-co-crystals for precise boron neutron capture therapy for brain glioma in situ // *Nano Today*. 2022. (45). C. 101558. DOI:10.1016/J.NANTOD.2022.101558.
129. Pulagam K.R., Gona K.B., Gómez-Vallejo V., Meijer J., Zilberfain C., Estrela-Lopis I., Baz Z., Cossío U., Llop J. Gold Nanoparticles as Boron Carriers for Boron Neutron Capture Therapy: Synthesis, Radiolabelling and In Vivo Evaluation // *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 3609. 2019. № 19(24). C. 3609. DOI:10.3390/MOLECULES24193609.
130. Feiner I.V.J., Pulagam K.R., Uribe K.B., Passannante R., Simó C., Zamacola K., Gómez-Vallejo V., Herrero-Álvarez N., Cossío U., Baz Z., Caffarel M.M., Lawrie C.H., Vugts D.J., Rejc L., Llop J. Pre-targeting with ultra-small nanoparticles: boron carbon dots as drug candidates for boron neutron capture therapy // *Journal of materials chemistry. B*. 2021. № 2(9). C. 410–420. DOI:10.1039/D0TB01880E.
131. Chien Y.C., Hsu Y.T., Chiang C.W., Keng P.Y., Wang T.W. Investigating the electrostatic complexation of BCNO nanoparticles with a stimuli-responsive double hydrophilic graft copolymer // *Giant*. 2023. (14). C. 100162. DOI:10.1016/J.GIANT.2023.100162.
132. Li J., Sun Q., Lu C., Xiao H., Guo Z., Duan D., Zhang Z., Liu T., Liu Z. Boron encapsulated in a liposome can be used for combinational neutron capture therapy // *Nature Communications* 2022 13:1. 2022. № 1(13). C. 1–11. DOI:10.1038/s41467-022-29780-w.
133. Wathoni N., Puluhulawa L.E., Joni I.M., Muchtaridi M., Mohammed A.F.A., Elamin K.M., Milanda T., Gozali D. Monoclonal antibody as a targeting mediator for nanoparticle targeted delivery system for lung cancer // *Drug Delivery*. 2022. № 1(29). C. 2959–2970. DOI:10.1080/10717544.2022.2120566.
134. Lee W., Sarkar S., Ahn H., Kim J.Y., Lee Y.J., Chang Y., Yoo J. PEGylated liposome encapsulating nido-carborane showed significant tumor suppression in boron neutron capture therapy (BNCT) // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020. № 3(522). C. 669–675. DOI:10.1016/J.BBRC.2019.11.144.

135. Kang W., Svirskis D., Sarojini V., McGregor A.L., Bevitt J., Wu Z. Cyclic-RGDyC functionalized liposomes for dual-targeting of tumor vasculature and cancer cells in glioblastoma: An in vitro boron neutron capture therapy study // *Oncotarget*. 2017. № 22(8). C. 36614–36627. DOI:10.18632/ONCOTARGET.16625.
136. Nakase I., Aoki A., Sakai Y., Hirase S., Ishimura M., Takatani-Nakase T., Hattori Y., Kirihata M. Antibody-based receptor targeting using an Fc-binding peptide-dodecaborate conjugate and macropinocytosis induction for boron neutron capture therapy // *ACS Omega*. 2020. № 36(5). C. 22731–22738. DOI:10.1021/ACSOMEGA.0C01377/SUPPL_FILE/AO0C01377_SI_001.PDF.
137. Rondina A., Fossa P., Orro A., Milanesi L., De Palma A., Perico D., Mauri P.L., D’Ursi P. A boron delivery antibody (BDA) with boronated specific residues: New perspectives in boron neutron capture therapy from an in silico investigation // *Cells*. 2021. № 11(10). C. 3225. DOI:10.3390/CELLS10113225/S1.
138. Kuthala N., Shanmugam M., Yao C.L., Chiang C.S., Hwang K.C. One step synthesis of ¹⁰B-enriched ¹⁰BPO₄ nanoparticles for effective boron neutron capture therapeutic treatment of recurrent head-and-neck tumor // *Biomaterials*. 2022. (290). C. 121861. DOI:10.1016/J.BIOMATERIALS.2022.121861.
139. Paul M., Itoo A.M., Ghosh B., Biswas S. Current trends in the use of human serum albumin for drug delivery in cancer // *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2022. № 11(19). C. 1449–1470. DOI:10.1080/17425247.2022.2134341.
140. Maeda * H, Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review a , a a b c // *Journal of Controlled Release*. 2000. (65). C. 271–284.
141. Sleep D. Albumin and its application in drug delivery // *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2015. № 5(12). C. 793–812. DOI:10.1517/17425247.2015.993313.
142. Kikuchi S., Kanoh D., Sato S., Sakurai Y., Suzuki M., Nakamura H. Maleimide-functionalized closo-dodecaborate albumin conjugates (MID-AC): Unique ligation at cysteine and lysine residues enables efficient boron delivery to tumor for neutron capture therapy 2016. DOI:10.1016/j.jconrel.2016.07.017.

143. Nakamura H., Kikuchi S., Kawai K., Ishii S., Sato S. Closo-Dodecaborate-conjugated human serum albumins: Preparation and in vivo selective boron delivery to tumor // *Pure and Applied Chemistry*. 2018. № 4(90). C. 745–753. DOI:10.1515/PAC-2017-1104/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
144. Nakamura H., Kawai K., Nishimura K., Okada S., Sato S., Suzuki M., Takata T. Cyclic rgd-functionalized closo-dodecaborate albumin conjugates as integrin targeting boron carriers for neutron capture therapy // *Molecular Pharmaceutics*. 2020. № 10(17). C. 3740–3747.
DOI:10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.0C00478/ASSET/IMAGES/LARGE/MP0C00478_0007.JPEG.
145. Monti Hughes A., Goldfinger J.A., Palmieri M.A., Ramos P., Santa Cruz I.S., De Leo L., Garabalino M.A., Thorp S.I., Curotto P., Pozzi E.C.C., Kawai K., Sato S., Itoiz M.E., Trivillin V.A., Guidobono J.S., Nakamura H., Schwint A.E. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) Mediated by Maleimide-Functionalized Closo-Dodecaborate Albumin Conjugates (MID:BSA) for Oral Cancer: Biodistribution Studies and In Vivo BNCT in the Hamster Cheek Pouch Oral Cancer Model // *Life (Basel, Switzerland)*. 2022. № 7(12). DOI:10.3390/LIFE12071082.
146. Nishimura K., Harrison S., Kawai K., Morita T., Miura K., Okada S., Nakamura H. Iodophenyl-conjugated closo-dodecaborate as a promising small boron molecule that binds to serum albumin and accumulates in tumor // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2022. (72). C. 128869. DOI:10.1016/J.BMCL.2022.128869.
147. Tsujino K., Kashiwagi H., Nishimura K., Kayama R., Yoshimura K., Fukuo Y., Shiba H., Hiramatsu R., Nonoguchi N., Furuse M., Takami T., Miyatake S.I., Hu N., Takata T., Tanaka H., Suzuki M., Kawabata S., Nakamura H., Wanibuchi M. Improved Boron Neutron Capture Therapy Using Integrin $\alpha\beta 3$ -Targeted Long-Retention-Type Boron Carrier in a F98 Rat Glioma Model // *Biology* 2023, Vol. 12, Page 377. 2023. № 3(12). C. 377. DOI:10.3390/BIOLOGY12030377.
148. Popova T., Dymova M.A., Koroleva L.S., Zakharova O.D., Lisitskiy V.A., Raskolupova V.I., Sycheva T., Taskaev S., Silnikov V.N., Godovikova T.S. Homocystamide Conjugates of Human Serum Albumin as a Platform to Prepare Bimodal Multidrug

149. Jr T.P. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications 1995.
150. Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K. Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis* // *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1971. № 3(252). C. 1102–1106.
151. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of immunological methods*. 1983. № 1–2(65). C. 55–63. DOI:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
152. Raskolupova V.I., Wang M., Dymova M.A., Petrov G.O., Shchudlo I.M., 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. № 6(28). C. 2672. DOI:10.3390/MOLECULES28062672/S1.
153. Chubarov A.S., Zakharova O.D., Koval O.A., Romaschenko A. V., Akulov A.E., Zavjalov E.L., Razumov I.A., Koptyug I. V., Knorre D.G., Godovikova T.S. Design of protein homocystamides with enhanced tumor uptake properties for ¹⁹F magnetic resonance imaging // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2015. № 21(23). C. 6943–6954. DOI:10.1016/J.BMC.2015.09.043.
154. Lisitskiy V.A., Khan H., Popova T. V., Chubarov A.S., Zakharova O.D., Akulov A.E., Shevelev O.B., Zavjalov E.L., Koptyug I. V., Moshkin M.P., Silnikov V.N., Ahmad S., Godovikova T.S. Multifunctional human serum albumin-therapeutic nucleotide conjugate with redox and pH-sensitive drug release mechanism for cancer theranostics // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2017. № 16(27). C. 3925–3930. DOI:10.1016/J.BMCL.2017.05.084.
155. Popova T. V., Khan H., Chubarov A.S., Lisitskiy V.A., Antonova N.M., Akulov A.E., Shevelev O.B., Zavjalov E.L., Silnikov V.N., Ahmad S., Godovikova T.S. Biotin-decorated anti-cancer nucleotide theranostic conjugate of human serum albumin: Where the seed meets the soil? // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018. № 3(28). C. 260–264. DOI:10.1016/J.BMCL.2017.12.061.

156. Popova T. V., Krumkacheva O.A., Burmakova A.S., Spitsyna A.S., Zakharova O.D., Lisitskiy V.A., Kirilyuk I.A., Silnikov V.N., Bowman M.K., Bagryanskaya E.G., Godovikova T.S. Protein modification by thiolactone homocysteine chemistry: a multifunctionalized human serum albumin theranostic // *RSC Medicinal Chemistry*. 2020. № 11(11). C. 1314–1325. DOI:10.1039/C9MD00516A.
157. Popova T. V., Pyshnaya I.A., Zakharova O.D., Akulov A.E., Shevelev O.B., Poletaeva J., Zavjalov E.L., Silnikov V.N., Ryabchikova E.I., Godovikova T.S. Rational Design of Albumin Theranostic Conjugates for Gold Nanoparticles Anticancer Drugs: Where the Seed Meets the Soil? // *Biomedicines*. 2021. № 1(9). C. 1–15. DOI:10.3390/BIOMEDICINES9010074.
158. Chubarov A.S., Shakirov M.M., Koptuyug I. V., Sagdeev R.Z., Knorre D.G., Godovikova T.S. Synthesis and characterization of fluorinated homocysteine derivatives as potential molecular probes for ¹⁹F magnetic resonance spectroscopy and imaging // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011. № 13(21). C. 4050–4053. DOI:10.1016/J.BMCL.2011.04.119.
159. Marczak Ł., Sikora M., Stobiecki M., Jakubowski H. Analysis of site-specific N-homocysteinylation of human serum albumin in vitro and in vivo using MALDI-ToF and LC-MS/MS mass spectrometry // *Journal of Proteomics*. 2011. № 7(74). C. 967–974. DOI:10.1016/J.JPROT.2011.01.021.
160. Głowacki R., Jakubowski H. Cross-talk between Cys-34 and Lysine Residues in Human Serum Albumin Revealed by N-Homocysteinylation // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. № 12(279). C. 10864–10871. DOI:10.1074/JBC.M313268200.
161. Ruiz-Cabello J., Barnett B.P., Bottomley P.A., Bulte J.W.M. Fluorine (¹⁹F) MRS and MRI in biomedicine // *NMR in biomedicine*. 2011. № 2(24). C. 114. DOI:10.1002/NBM.1570.
162. Asija S., Chatterjee A., Yadav S., Chekuri G., Karulkar A., Jaiswal A.K., Goda J.S., Purwar R. Combinatorial approaches to effective therapy in glioblastoma (GBM): Current status and what the future holds // *International Reviews of Immunology*. 2022. № 6(41). C. 582–605. DOI:10.1080/08830185.2022.2101647.

163. Yu X., Zhu W., Di Y., Gu J., Guo Z., Li H., Fu D., Jin C. Triple-functional albumin-based nanoparticles for combined chemotherapy and photodynamic therapy of pancreatic cancer with lymphatic metastases // *International Journal of Nanomedicine*. 2017. (12). C. 6771. DOI:10.2147/IJN.S131295.
164. Guo Z., Wang F., Di Y., Yao L., Yu X., Fu D., Li J., Jin C. Antitumor effect of gemcitabine-loaded albumin nanoparticle on gemcitabine-resistant pancreatic cancer induced by low hENT1 expression // *International Journal of Nanomedicine*. 2018. (13). C. 4869. DOI:10.2147/IJN.S166769.
165. Paroha S., Verma J., Dubey R.D., Dewangan R.P., Molugulu N., Bapat R.A., Sahoo P.K., Kesharwani P. Recent advances and prospects in gemcitabine drug delivery systems // *International Journal of Pharmaceutics*. 2021. (592). DOI:10.1016/J.IJPHARM.2020.120043.
166. PETERS R.A. Mechanism of the toxicity of the active constituent of *Dichapetalum cymosum* and related compounds // *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*. 1957. (18). C. 113–159. DOI:10.1002/9780470122631.CH3.
167. Cerqueira N.M.F.S.A., Fernandes P.A., Ramos M.J. Understanding Ribonucleotide Reductase Inactivation by Gemcitabine // *Chemistry – A European Journal*. 2007. № 30(13). C. 8507–8515. DOI:10.1002/CHEM.200700260.
168. Alvarellos M.L., Lamba J., Sangkuhl K., Thorn C.F., Wang L., Klein D.J., Altman R.B., Klein T.E. PharmGKB summary: gemcitabine pathway // *Pharmacogenetics and genomics*. 2014. № 11(24). C. 564–574. DOI:10.1097/FPC.0000000000000086.