
ОТКРЫТАЯ НАУКА

УДК 577.112.4, 54.052

DOI: 10.15372/KhUR2024610

EDN: TKOSWK

Изучение *in vitro* влияния гомоцистеинового линкера на поведение конъюгатов сывороточного альбумина человека и монометилауристатина F

М. ВАН^{1,2}, В. И. РОГАЛЕВА³, Т. В. ПОПОВА^{1,3}, О. Д. ЗАХАРОВА³, Т. С. ГОДОВИКОВА³, В. Н. СИЛЬНИКОВ^{3,4}

¹Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

²Институт перспективных исследований Фучжоу Фуяо,
Фучжоу, Китай

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

E-mail: silnik@niboch.nsc.ru

⁴ООО “НаноТех-С”,
Новосибирск, Россия

(Поступила 02.11.2024; принята к печати 20.11.2024)

Аннотация

Синтезированы флуоресцентные конъюгаты сывороточного альбумина человека и цитостатического препарата – монометилауристатина F, имеющего расщепляемый пептидный линкер ValCit. В синтезе использованы стратегии прямого присоединения терапевтического пептида к альбумину и присоединение с помощью N-трифторацетилгомоцистеинового линкера. Методом конфокальной микроскопии установлено, что конъюгат, содержащий гомоцистеиновый линкер, эффективно накапливается в цитоплазме опухолевых клеток линии MCF-7, в то время как конъюгат, полученный прямым присоединением пептида к белку, накапливается преимущественно на поверхности клеток. Исследования конъюгатов *in vitro* на линиях клеток MCF-7 и T98G выявили проявление большей цитотоксичности монометилауристатина F в отношении раковых клеток линий MCF-7 и T98G после его присоединения к альбумину. Установлено, что конъюгат, содержащий гомоцистеиновый линкер, проявлял большую цитотоксичность в сравнении с конъюгатом, полученным прямым присоединением монометилауристатина F к альбумину, несмотря на меньшую нагрузку белка терапевтическим пептидом.

Ключевые слова: сывороточный альбумин, тиолактон гомоцистеина, монометилауристатин F, тераностика, противоопухолевая цитотоксичность

ВВЕДЕНИЕ

Центральной проблемой создания высокоэффективных противоопухолевых препаратов, обладающих низкой токсичностью для здоровых тканей, является обеспечение таргетной доставки терапевтических агентов в опухолевые ткани. В последние десятилетия предпринимаются многочисленные попытки использовать в качестве таргетного носителя белок альбу-

мин [1, 2]. Конъюгаты альбумина могут эффективно накапливаться в опухолях благодаря EPR (enhanced permeability and retention) эффекту, который проявляется в повышенной сосудистой проницаемости и низком лимфатическом дренаже опухолевых тканей [3, 4], а также благодаря наличию в опухолях гиперэкспрессии секретлируемого белка, богатого цистеином (SPARC), – матрицеллярного гликопротеина, связывающего альбумин с высокой аффинностью и способ-

ствующего проникновению последнего внутрь опухолевых клеток [5]. Среди прочих преимуществ альбумина можно отметить биосовместимость, биodeградируемость, возможность присоединения к нему различных функционально значимых молекул и, что немаловажно, его невысокую стоимость.

Однако, несмотря на многочисленные попытки использования альбумина в качестве носителя для противоопухолевых препаратов, в настоящее время только один препарат Абраксан® (Abraxis BioScience LLC, США), представляющий собой наночастицы на основе экзогенного сывороточного альбумина человека (HSA) с паклитакселем, получил официальное одобрение Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA, США). Во многом это связано с трудностью получения нековалентных комплексов терапевтических агентов с альбумином [6].

Как отмечалось выше, альбумин может быть легко модифицирован по многочисленным алифатическим аминокислотным остаткам лизина, либо по единственной частично свободной SH-группе остатка цистеина (Cys-34). Но многочисленные попытки создания ковалентных конъюгатов альбумина с противоопухолевыми агентами к настоящему времени также не привели к созданию эффективных противоопухолевых препаратов. Во многом это связано с нарушением структуры альбумина в результате бесконтрольной химической модификации. Было показано, что в отличие от нативного альбумина химически модифицированный альбумин обладает в 1000 раз большим сродством к двум рецепторам – gp18 и gp30. Связывание модифицированного альбумина с данными рецепторами приводит к эндоцитозу и попаданию его в лизосому. Таким образом, неприродная химическая модификация альбумина может приводить к значительному сокращению времени циркуляции конъюгатов в крови и высвобождению терапевтических молекул в нецелевых тканях [7]. Исключение составляет конъюгат альбумина с доксорубицином (DOXO-EMCN) [8], в дальнейшем получивший название Альдоксорубин. В настоящее время он находится на различных стадиях клинического испытания (от Ib до III, для разных видов рака) [9]. Для создания этого конъюгата использована стратегия сайт-специфичной модификации альбумина по SH-группе Cys-34. Этот тип модификации не приводит к нарушению структуры альбумина, однако конъюгаты такого вида могут иметь лишь незначительную терапевти-

ческую нагрузку (0.3–0.4 терапевтической молекулы на одну молекулу альбумина) [10].

Ранее нами была предложена химическая модификация альбумина, основанная на ацилировании определенных остатков лизина *N*-модифицированным тиолактоном гомоцистеина [11]. Применение производных тиолактона позволяет проводить модификацию альбумина по определенным остаткам лизинов без сокращения времени циркуляции полученных конъюгатов в крови.

В настоящей работе синтезированы флуоресцентные конъюгаты HSA и монометилауростатина F (MMAF) – цитостатического пептида, используемого для создания противоопухолевых препаратов. Цель данной работы – сравнение противоопухолевой активности *in vitro* двух типов конъюгатов HSA с MMAF, полученных как прямой модификацией остатков лизина HSA, так и сайт-специфичной модификацией посредством применения линкера – *N*-трифторацетилгомоцистеина (HcyTFAc).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В качестве исходного соединения служил сывороточный альбумин человека (HSA) (номер продукта A3784, Sigma-Aldrich, США). Остальные используемые реактивы (кроме указанных дополнительно) также были производства Sigma-Aldrich (США).

В работе использовали воду, очищенную системой Milli-Q, с проводимостью более 18 МОм см, 0.01 М фосфатный буфер (PBS) (pH 7.3–7.5, Biolog, Россия) и органические растворители отечественного производства классификации “х. ч.” и “ч. д. а.”, очищенные в случае необходимости по стандартным методикам.

Пептид mc-vc-pab-MMAF был предоставлен фармацевтической компанией Suzhou Jianhua Co., Ltd. (Китай).

Краситель сульфо-Су5 малеимид (Су5) был приобретен в ООО “Люмипроб Рус” (Россия).

Клеточные линии MCF-7, T98G были получены из Российской коллекции клеточных культур (Российское отделение ЭТКС).

Опухолевые клетки выращивали при 37 °C в атмосфере с содержанием 5 % CO₂ на среде IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), содержащей 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) (Invitrogen, США).

Методики исследования

Электронные спектры поглощения были получены на спектрометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Спектры поглощения растворов регистрировали в кварцевых кюветах с длиной пути 0.1 см. Концентрацию HSA измеряли на длине волны 278 нм с использованием коэффициента экстинкции $\varepsilon = 3.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Концентрацию красителя Су5 в составе конъюгатов определяли на длине волны 646 нм с использованием коэффициента экстинкции $\varepsilon = 2.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Спектры ЯМР ^{19}F регистрировали на спектрометрах AV-400 (Bruker, Германия) при 25 °C в 5-миллиметровых ЯМР-ампулах. Химические сдвиги (δ) представлены в миллионных долях (м. д.), а константы спин-спиновой взаимодействия (J) – в Герцах (Гц). В качестве внешнего эталона для химических сдвигов ^{19}F ЯМР использовали C_6F_6 (δ 0.00 м. д.).

MALDI-TOF масс-спектры белков и пептидов регистрировали на спектрометре Bruker Autoflex Speed (Bruker, Германия). Масс-спектры получены в положительном линейном режиме. В качестве матрицы применяли 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. Образцы белка обессоливали с использованием наконечников ZipTip C4 (Merck Millipore, США). Образцы пептида MMAF, растворенного в тетрагидрофуране, обессоливали с использованием наконечников ZipTip C18 (Merck Millipore, США). Масс-спектры были получены путем усреднения 3000 лазерных снимков. Внешнюю калибровку обеспечивали с помощью HSA (m/z 66.5 кДа, $[\text{M} + \text{H}]^+$).

Конъюгаты HSA анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (PAAG) при наличии додецилсульфата натрия (SDS) в условиях Лэммли [12]. Для денатурирующих условий использовали дитиотреитол (DTT).

Белковые конъюгаты очищали с помощью ультрафильтрационных центриконов Amicon Centrifrep YM 30 (Merck Millipore, США), пропускающих молекулы с молекулярной массой (M_r) менее 3000 Да. Очистку проводили 20-кратным центрифугированием при 9000 об/мин: десять раз центрифугирование проводили с промывкой продукта 10 % раствором диметилсульфоксида (DMSO) в PBS, затем десять раз – с промывкой PBS.

Цитотоксическую активность *in vitro* оценивали по выживаемости клеток линий MCF-7 или T98G в присутствии конъюгатов HSA. Выживаемость клеток оценивали с помощью стандартного МТТ-теста с использованием МТТ-

реагента – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида [13]. Эксперименты выполнены с применением 96-луночных микропланшет. В каждую лунку помещали около 2 тыс. клеток в 100 мкл полной питательной среды и выращивали в течение 24 ч при 37 °C в атмосфере с 5 % содержанием CO_2 . Затем среду в лунках заменяли порцией свежей среды или среды, содержащей один из трех конъюгатов HSA в концентрации от 10^{-3} до 10^{-6} М (последовательные 10-кратные разведения, три повтора для каждого образца конъюгата HSA). С контрольными образцами клеток проводили аналогичные манипуляции при отсутствии в среде конъюгатов HSA. Через 72 ч к клеткам добавляли МТТ-реагент в буфере PBS в объеме 10 мкл в конечной концентрации 0.5 мкг/мл и инкубировали далее в течение 3 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 . Выпавшие кристаллы формазана растворяли в 100 мкл изопропанола. Оптическое поглощение окрашенных изопропанольных растворов измеряли с помощью спектрофотометра Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, США) на длине волны 570 нм (пик) и 620 нм (базовая линия), используя раствор МТТ с изопропанолом как контроль. Результаты оценивали по отношению к контрольным пробам (без конъюгатов HSA). Оптическое поглощение растворенного в изопропанолe формазана пропорционально количеству живых клеток в пробе. Для каждой экспериментальной точки проводили не менее трех повторений и подсчитывали стандартную ошибку среднего значения. Выживаемость клеток (В, %) в опытных лунках определяли по формуле: $V = (\text{По}/\text{Пк}) \cdot 100$, где По и Пк – оптическое поглощение в опыте и контроле соответственно.

Исследование проникновения HSA-Су5-HcyTFAc-MMAF и HSA-Су5-MMAF в опухолевые клетки проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Покровные стекла с монослоем клеток (MCF-7) инкубировали в полной среде с образцами конъюгатов HSA в течение 1, 4 и 24 ч. Затем клетки дважды промывали буфером (10 mM Hepes, 0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl_2) и инкубировали их с 0.5 мкМ раствором красителя DAPI (20 мин при комнатной температуре). После этого клетки трижды промывали буфером и фиксировали 4 % раствором формалина в течение 10 мин. Флуоресцентные изображения конъюгатов HSA в клетках наблюдали с помощью системы лазерной сканирующей микроскопии LSM 510 (Carl Zeiss, Гер-

мания) в Центре микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Для обнаружения меченых Cy5 конъюгатов использовали стандартные фильтры (645 нм для возбуждения и 670 нм для испускания). Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Zen (Carl Zeiss, Германия).

Методики синтеза

Схема синтеза конъюгатов представлена на рис. 1.

Синтез HSA-Cy5 проводили согласно методике [14].

Синтез HSA-Cy5-HcyTFAc проводили согласно методике [15]. К 1.510 мл 0.84 мМ раствора HSA-Cy5 (1.27 мкмоль) в PBS добавляли 75.5 мкл 12.7 мМ раствора тиолактона трифторацетилгомоцистеина (HTLTFAc) (12.7 мкмоль) в DMSO. Соотношение PBS/DMSO = 20 : 1 (по объему). Реакционную смесь выдерживали при перемешивании в темноте в течение 42 ч при 37 °С. Продукт очищали от низкомолекулярных примесей (M_r менее 3000 Да) с использованием фильтров Amicon Centriprep YM30 (Millipore, США). Выход:

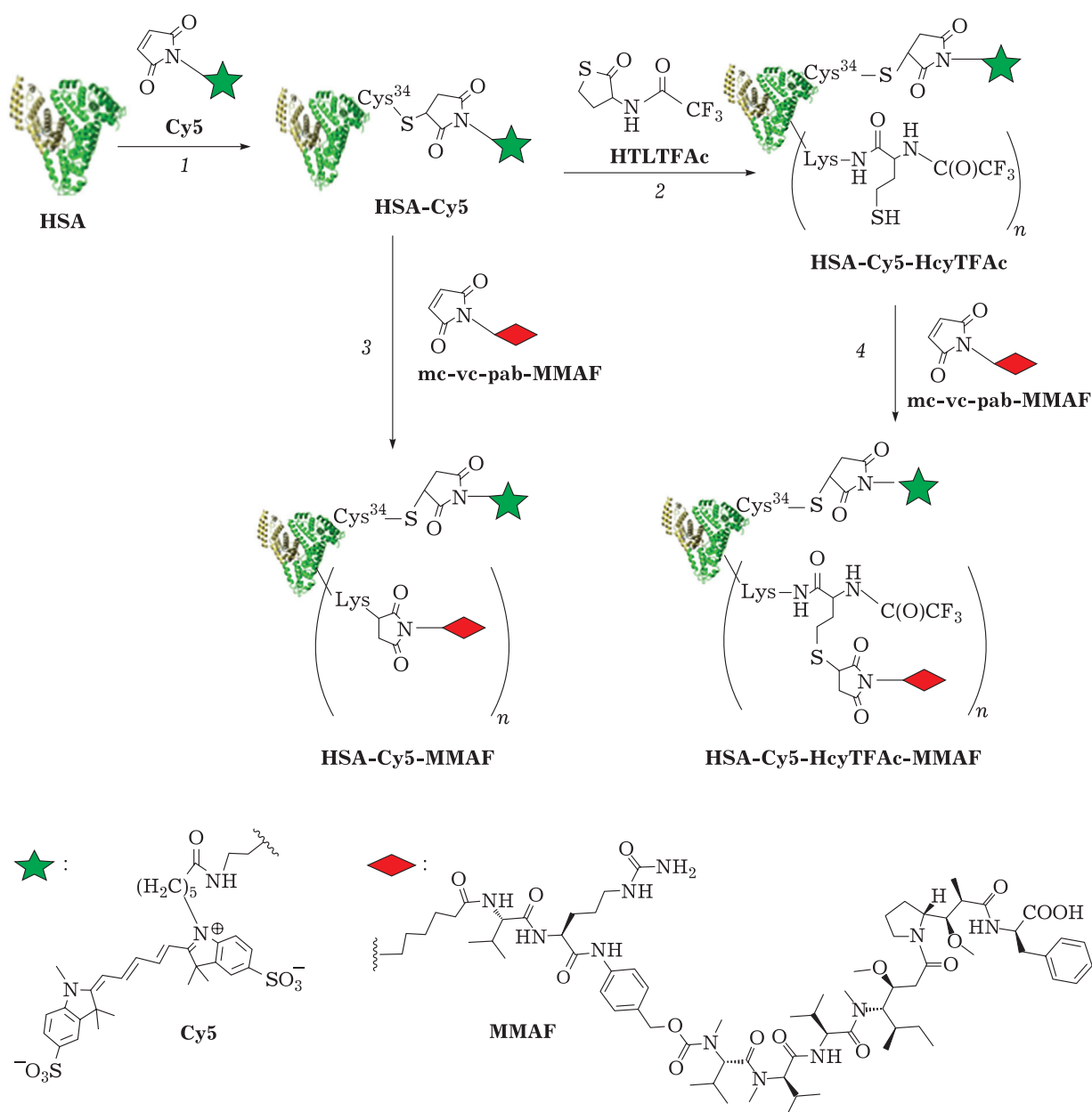


Рис. 1. Стратегия создания терапевтических конъюгатов на основе HSA и MMAF.

55 %. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7.4): $\lambda_{\max}$ 278 нм ($\varepsilon = (4.7 \pm 0.1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), $\lambda_{\max}$ 650 нм ($\varepsilon = (6.80 \pm 0.1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Спектр ЯМР ^{19}F (PBS (дейтерированный), δ , м. д.): 87.80 (с, CF_3). MALDI-TOF m/z : рассчитано 68122 Да (в него включены измеренное значение M_r для HSA (66500) и расчетные значения M_r для одного остатка Су5 (766) и четырех остатков НсуТФАс (856)). Измерено: 68122 Да.

Синтез конъюгата HSA-Су5-НсуТФАс-MMAF проводили согласно методике [15] с небольшими изменениями. К 882 мкл 0.7 мМ раствора HSA-Су5-НсуТФАс (0.617 мкмоль) в PBS добавляли раствор пептида MMAF (5.0 мг, 3.78 мкмоль) в 176.4 мкл DMSO. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании в темноте в течение 18 ч при 37 °C. Продукт очищали от низкомолекулярных примесей (M_r менее 3000 Да) с использованием фильтров Amicon Centriprep YM30. Выход: 92 %. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7.4): $\lambda_{\max}$ 278 нм ($\varepsilon = (5.2 \pm 0.1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), $\lambda_{\max}$ 650 нм ($\varepsilon = (6.80 \pm 0.1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Спектр ЯМР ^{19}F (PBS + D_2O , δ , м. д.): 87.70 (с, CF_3). MALDI-TOF m/z : расчетное значение M_r для HSA-Су5-НсуТФАс-MMAF 69452 Да (в него включены измеренное значение M_r для HSA (66500 Да), расчетные значения M_r для одного остатка Су5 (766 Да), четырех остатков НсуТФАс (856 Да) и одного остатка MMAF (1330 Да)). Измерено: 71449 Да (в среднем соответствует 2.6 остатка MMAF, присоединенного к молекуле HSA-Су5-НсуТФАс).

Синтез конъюгата HSA-Су5-MMAF проводили согласно методике [15] с небольшими изменениями. К 1.429 мл 0.7 мМ раствора HSA-Су5 (1 мкмоль) в PBS добавляли 286 мкл 0.021 М раствор MMAF (6.15 мкмоль) в DMSO. Соотношение PBS/DMSO = 5 : 1 (по объему). Реакционную смесь выдерживали при перемешивании в темноте в течение 18 ч при 37 °C. Продукт очищали от низкомолекулярных примесей (M_r менее 3000 Да) с использованием фильтров Amicon Centriprep YM30. Выход: 90 %. Электронный спектр поглощения (PBS, pH 7.4): $\lambda_{\max}$ 278 нм ($\varepsilon = (5.25 \pm 0.1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), $\lambda_{\max}$ 650 нм ($\varepsilon = (6.80 \pm 0.1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). MALDI-TOF m/z : рассчитано 68596 Да (включено измеренное значение M_r для HSA (66500 Да), расчетные значения M_r для одного остатка Су5 (766 Да) и одного остатка MMAF (1330 Да)). Измерено: 73916 Да (соответствует молекуле HSA-Су5 с пятью присоединенными остатками MMAF).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Коммерческий препарат альбумина, используемый в нашей работе, имеет только 25 % молекул белка, содержащих свободный остаток Cys-34. Таким образом, соотношение белка и красителя на данной стадии подбиралось с учетом полной модификации красителем всех свободных остатков цистеина без мечения белка по остаткам лизина. Поэтому был задействован двукратный избыток белка по отношению к красителю. По результатам электронной спектроскопии модификации красителем подвергается 27–29 % молекул HSA.

Пики, соответствующие массам в масс-спектрах белковых образцов, имеют широкое распределение и колоколообразную форму вследствие того, что сам белок может нести разнообразные противоионы и содержать некоторое количество природных модификаций, неравномерно распределенных по популяции молекул белка.

В случае конъюгата HSA-Су5 в масс-спектре наблюдалось четкое разделение популяции белков немодифицированного HSA и продукта конъюгации, дающего сигнал со сдвигом относительно пика HSA на 766 Да, что соответствует присоединению одного остатка красителя к одной молекуле белка, имеющей свободный остаток Cys-34. Наличие поглощения на длине волны 650 нм у конъюгата HSA-Су5, очищенного от неприсоединенного Су5, подтверждает введение красителя в структуру HSA.

В соответствии с поставленной задачей синтез конъюгатов HSA-Су5 с терапевтическим пептидом MMAF осуществляли с использованием двух различных подходов:

1) присоединение MMAF к белку через НсуТФАс – *N*-трифторацетилгомоцистеиновый линкер (см. рис. 1, стадии 1, 2 и 4);

2) прямое присоединение MMAF к белку (см. рис. 1, стадии 1 и 3).

Подход 1. Согласно первому подходу конъюгат HSA-Су5 был селективно ацилирован НТЛТФАс по определенным остаткам лизина в составе белка (см. рис. 1, стадия 2). При ацилировании происходит высвобождение меркаптогрупп гомоцистеина, по которым далее реагирует малеимидная группа в структуре пептида MMAF (см. рис. 1, стадия 4).

Основываясь на MALDI-TOF масс-спектрометрическом анализе трипсиновых фрагментов конъюгата HSA-Су5-НсуТФАс, полученного с

ТАБЛИЦА 1

Анализ сайтов модификации альбумина в конъюгате HSA-Cy5-HcyTFAc

Сайт	Пептидная последовательность ^a	M_r пептида (рассчитано)	M_r (рассчитано), пептид + ... ^б		m/z (измерено)	Количество пропущенных мест расщепления
			+ HcyTFAc	+ HcyTFAc + + IAA		
Lys-199	198 LK*CASLQK 205	949.4	1163.4	1220.4	1261.5 (1220.4 + Cl ⁻ , замена H ⁺ на Li ⁺)	1
Lys-414	414 K*VPQVSTPTLVEVSR 428	1639.7	1853.7	1910.7	1960.6 (1910.7 + 2F ⁻ , замена 2H ⁺ на 2Li ⁺)	1
Lys-557, Lys-560	546 AVMDDFAAFVEK*CCK*ADDK 564	2218.9	2432.9	2489.9	2519.7 (2489.9 + Na ⁺ , + H ⁺ , замена H ⁺ на Li ⁺)	2

^a Диапазон масс пептидов 500–5000 Да. Трипсин не расщепляет пептидные связи после остатков лизина с модифицированным боковым радикалом, таким образом, HcyTFAc-Lys остаток не может находиться на С-конце пептида. **K*** – остаток лизина, несущий группу HcyTFAc.

^б M_r (молекулярная масса): HcyTFAc 214 Да, IAA (йодацетамид) 57 Да. SH-группа гомоцистеина менее активна, чем SH-группа цистеина, поэтому IAA-фрагмент может отсутствовать в пептиде.

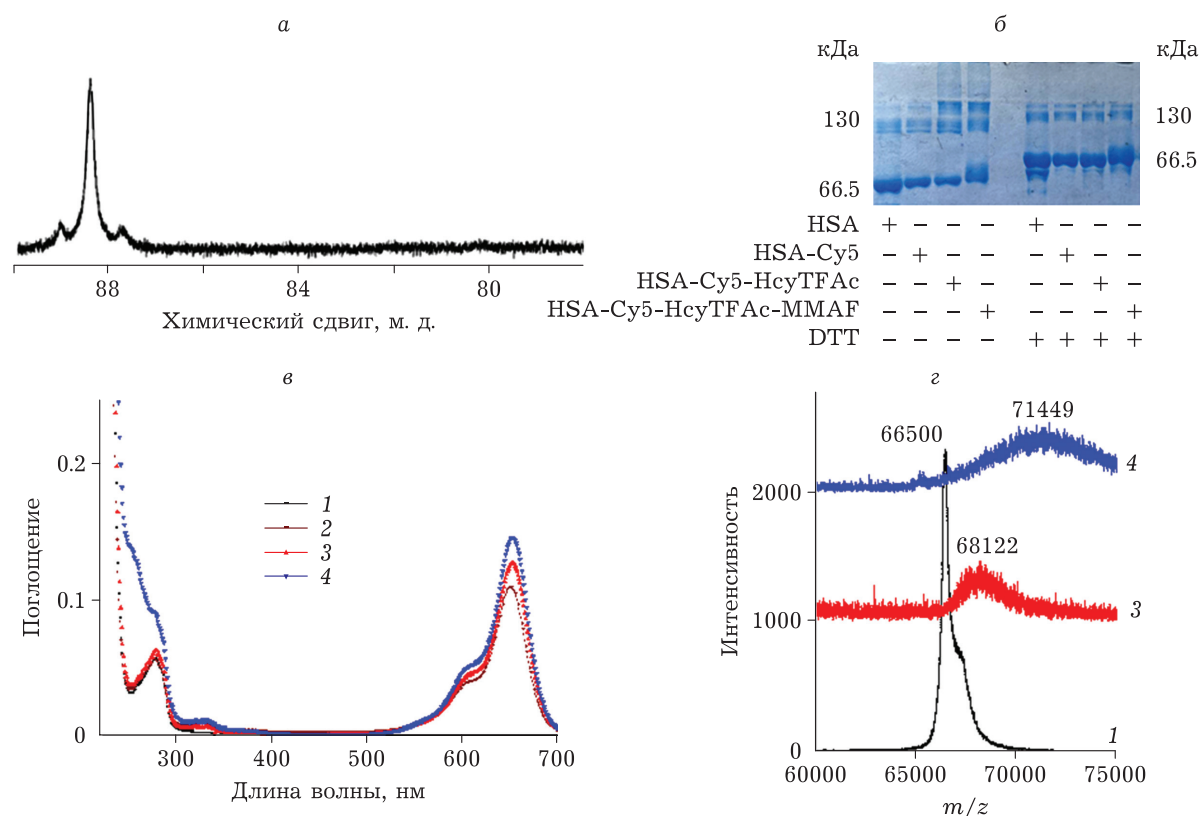


Рис. 2. Физико-химический анализ белковых образцов HSA (1), HSA-Cy5 (2), HSA-Cy5-HcyTFAc (3) и HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF (4): а – спектр ЯМР ¹⁹F соединения HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF в дейтерированном PBS, pH 7.4; б – электрофорез в 7 % растворе ПААГ при наличии додецилсульфата натрия (SDS); в – электронные спектры поглощения; г – данные MALDI-TOF спектрометрии. DTT – дитиотреитол.

использованием этого варианта синтеза, остатки HcyTFAc могут быть присоединены к аминокетам лизина Lys-199, Lys-414, Lys-557 и Lys-560 (табл. 1).

Степень очистки итогового конъюгата от неприсоединенного пептида определяли по отсутствию сигналов в масс-спектре в области 800–2000 Да. Для этого свободный пептид использовали как контрольный образец.

Разность M_r между HSA-Cy5 и HSA-Cy5-HcyTFAc составляет 856 Да. Эта добавка равноценна относительной атомной массе четырех остатков HcyTFAc (M_r одного остатка 214 Да). Присоединение пептида к HSA-Cy5-HcyTFAc дает прирост M_r конъюгата на 3422 Да, что соответствует присоединению в среднем 2.6 молекулы пептида: каждый малеимидный аналог пептида имеет M_r 1330 Да (рис. 2, з).

Присоединение HTLTFAc также было подтверждено методом ^{19}F ЯМР-спектроскопии (см. рис. 2, а). Наличие в структуре конъюгата HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF красителя Cy5 и пептида MMAF также подтверждается наличием полос поглощения в коротковолновой области электронного спектра и при длине волны 650 нм (см. рис. 2, в).

Подход 2. В рамках другой стратегии создания конъюгата HSA-Cy5 с MMAF было проведено прямое присоединение малеимидного производного пептида MMAF по нуклеофильным остаткам белка (см. рис. 1, стадии 1 и 3). В соответствии с этим подходом пептид был присоединен к HSA-Cy5 напрямую, без предварительного введения гомоцистеинового фрагмента. По аналогии с первым подходом введения в белок остатка MMAF использовали 6.15-кратный избыток последнего.

Исходя из данных MALDI-TOF спектрометрии (рис. 3, в), в среднем произошло присоединение пяти молекул пептида MMAF к одной молекуле белка (M_r пептида 1330 Да, разность M_r HSA-Cy5 и HSA-Cy5-MMAF составляет 6650 Да). Степень очистки итогового конъюгата HSA-Cy5-MMAF от непрореагировавшего пептида MMAF оценивали аналогично предыдущему белковому конъюгату с пептидом. Присоединение MMAF подтверждается изменениями в коротковолновой области электронного спектра поглощения белка (см. рис. 3, а). Поскольку все остатки Cys-34 в белке уже заняты красителем Cy5, очевидно, что присоединение пептида произошло по остаткам лизина.

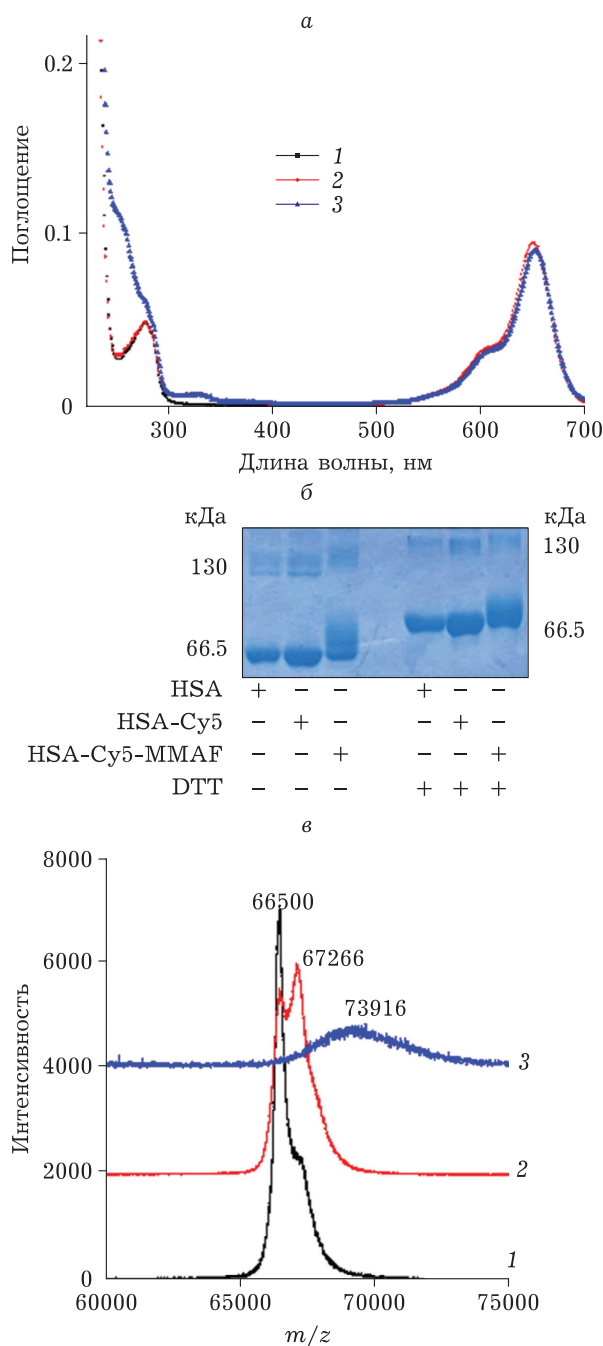


Рис. 3. Физико-химический анализ белковых образцов HSA (1), HSA-Cy5 (2) и HSA-Cy5-MMAF (3): а – электронные спектры поглощения; б – электрофорез в 7 % растворе ПААГ при наличии додецилсульфата натрия (SDS); в – данные MALDI-TOF спектрометрии. DTT – дитиотреитол.

Оценка цитотоксичности конъюгатов HSA в отношении опухолевых культур клеток

Результаты исследований конъюгатов HSA на цитотоксическую активность представлены на рис. 4. Данные свидетельствуют о том, что введение в молекулу альбумина красителя и остатка гомоцистеина не приводит к появлению

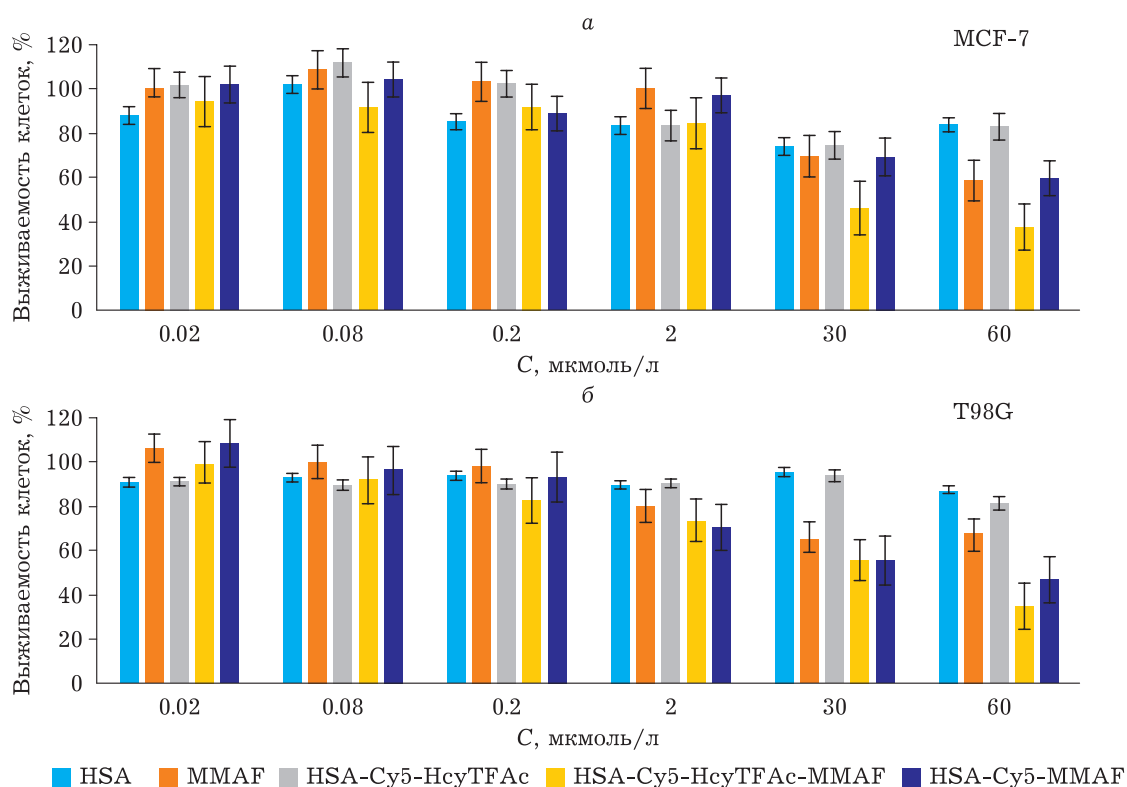


Рис. 4. Исследование цитотоксичности конъюгатов HSA в отношении линий клеток рака молочной железы человека MCF-7 (а) и глиобластомы человека T98G (б). С (мкмоль/л) – концентрация конъюгатов HSA, использованная при обработке клеток.

значимого токсического эффекта в сравнении с нативным альбумином. В то же время конъюгат, полученный с использованием тиолактона гомоцистеина в качестве промежуточного звена, обладает большей цитотоксичностью в отношении клеток рака молочной железы (MCF-7) и глиобластомы человека (T98G), чем конъюгат, полученный прямым присоединением терапевтического пептида к белку, даже несмотря на то, что в последнем конъюгате содержится вдвое больше присоединенных терапевтических пептидов.

Оценка проникновения конъюгатов HSA в опухолевые клетки

Для оценки проникновения в клетки конъюгатов альбумина и MMAF была проведена лазерная сканирующая конфокальная микроскопия линии MCF-7, обработанной конъюгатами HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF и HSA-Cy5-Hcy-MMAF (рис. 5). Анализ послойных срезов клеток, инкубированных с различными конъюгатами, свидетельствует, что в отличие от конъюгата HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF конъюгат HSA-Cy5-MMAF сосредоточен преимущественно на поверхности клеток (см. рис. 5, б).

Наиболее наглядно различие в распределении конъюгатов HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF и HSA-Cy5-MMAF можно увидеть на рис. 5, а, где представлены объемные изображения клеток, построенные на основе послойных срезов, обработанных с помощью программного обеспечения Zen (Carl Zeiss).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы флуоресцентные конъюгаты сывороточного альбумина человека и малеимидного производного монометилаутистатина F, имеющего расщепляемый линкер ValCit. При этом были использованы стратегии прямого присоединения пептида к альбумину (конъюгат HSA-Cy5-MMAF) и присоединения пептида через N-трифторацетилгомоцистеиновый линкер (конъюгат HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAE).

Исследования цитотоксичности данных конъюгатов *in vitro* на линиях клеток MCF-7 и T98G свидетельствуют, что при концентрациях выше 2 мкМ целевые конъюгаты проявляют выраженную дозозависимую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, сопоставимую или превосходящую цитотоксичность исходного

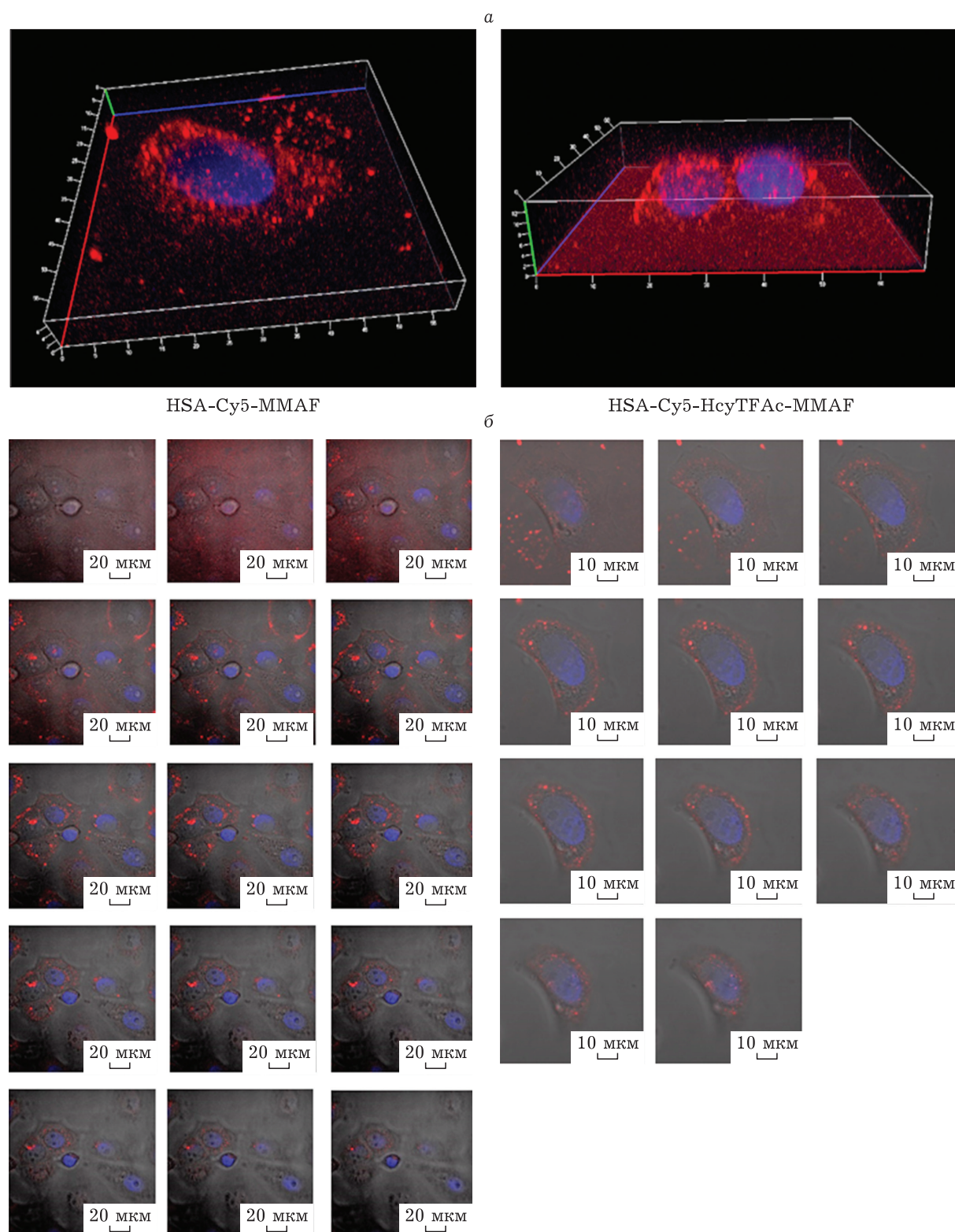


Рис. 5. Результаты исследования проникновения конъюгатов HSA в клетки MCF-7 методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии: а – клетки MCF-7 после 4 ч инкубации с конъюгатами HSA-Cy5-MMAF и HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF (красный цвет). Синий цвет – нуклеиновые кислоты, окрашенные красителем DAPI; б – послойные срезы клеток MCF-7, инкубированных с конъюгатами HSA-Cy5-MMAF и HSA-Cy5-HcyTFAc-MMAF.

пептида ММАФ. При этом конъюгат, содержащий N-трифторацетилгомоцистеиновый линкер, обладает большей цитотоксичностью, чем конъюгат, полученный прямым присоединением ММАФ к белку, несмотря на то, что в последнем содержится вдвое больше присоединенных остатков ММАФ. Методом конфокальной микроскопии показано эффективное накопление препарата, содержащего гомицистеиновый линкер, в цитоплазме опухолевых клеток линии MCF-7, в то время как конъюгат, полученный прямым присоединением пептида к белку, накапливается преимущественно на поверхности клеток. Это подтверждает эффективность предлагаемой стратегии модификации альбумина малеимидным аналогом терапевтической молекулы через гомицистеиновый фрагмент.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН (проект № 121031300042-1).

Работа выполнена с использованием оборудования Центра масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН и Химического исследовательского центра коллективного пользования СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Lamichhane S., Lee S. Albumin nanoscience: homing nanotechnology enabling targeted drug delivery and therapy // *Arch. Pharmacol. Res.* 2020. Vol. 43, No. 1. P. 118–133.
- 2 Srivastava A., Prajapati A. Albumin and functionalized albumin nanoparticles: production strategies, characterization, and target indications // *Asian Biomed.* 2020. Vol. 14, No. 6. P. 217–242.
- 3 Yhee J. Y., Jeon S., Yoon H. Y., Shim M. K., Ko H., Min J., Na J. H., Chang H., Han H., Kim J.-H., Suh M., Lee H., Park J. H., Kim K., Kwon I. C. Effects of tumor microenvironments on targeted delivery of glycol chitosan nanoparticles // *J. Controlled Release.* 2017. Vol. 267. P. 223–231.
- 4 Elzoghby A. O., Samy W. M., Elgindy N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems // *J. Controlled Release.* 2012. Vol. 157, No. 2. P. 168–182.
- 5 Desai N., Trieu V., Damascelli B., Soon-Shiong P. SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients // *Transl. Oncol.* 2009. Vol. 2, No. 2. P. 59–64.
- 6 Kratz F. A clinical update of using albumin as a drug vehicle – A commentary // *J. Controlled Release.* 2014. Vol. 190. P. 331–336.
- 7 Sleep D. Albumin and its application in drug delivery // *Expert Opin. Drug Delivery.* 2015. Vol. 12, No. 5. P. 793–812.
- 8 Gong J., Yan J., Forscher C., Hendifar A. Aldoxorubicin: a tumor-targeted doxorubicin conjugate for relapsed or refractory soft tissue sarcomas // *Drug Des. Dev. Ther.* 2018. Vol. 12. P. 777–786.
- 9 Chawla S. P., Chua V. S., Hendifar A. F., Quon D. V., Soman N., Sankhala K. K., Wieland D. S., Levitt D. J. A phase 1B/2 study of aldoxorubicin in patients with soft tissue sarcoma // *Cancer.* 2015. Vol. 121, No. 4. P. 570–579.
- 10 Kratz F., Müller-Driver R., Hofmann I., Dreves J., Unger C. A novel macromolecular prodrug concept exploiting endogenous serum albumin as a drug carrier for cancer chemotherapy // *J. Med. Chem.* 2000. Vol. 43, No. 7. P. 1253–1256.
- 11 Пат. RU 2629844 C1, 2017.
- 12 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 // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252, No. 3. P. 1102–1106.
- 13 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. Vol. 65, No. 1–2. P. 55–63.
- 14 Chubarov A. S., Zakharova O. D., Koval O. A., Romaschenko A. V., Akulov A. E., Zavjalov E. L., Razumov I. A., Kopyug I. V., Knorre D. G., Godovikova T. S. Design of protein homocystamides with enhanced tumor uptake properties for ^{19}F magnetic resonance imaging // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. Vol. 23, No. 21. P. 6943–6954.
- 15 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 delivery systems for boron neutron capture therapy // *Molecules.* 2021. Vol. 26, No. 21. P. 6537–6553.