



УДК 577.112.4;54.052

ПОЛУЧЕНИЕ БОРСОДЕРЖАЩЕГО S-НИТРОЗОТИОЛА НА ОСНОВЕ ГОМОЦИСТЕИНИЛАМИДОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ НО-ХИМИЧЕСКОЙ И БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

© 2025 г. Т. В. Попова*, **, М. Ван**, Т. Н. Курочкин**, С. А. Цыремпилов**,
О. Д. Захарова*, В. Н. Сильников*, #, Т. С. Годовикова*, **

* Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

** Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 16.09.2024 г.

После доработки 01.10.2024 г.

Принята к публикации 02.10.2024 г.

Стратегическая цель работы – создание на основе сывороточного альбумина человека (HSA), меченного флуорофором, клинически значимого экзогенного донора NO, несущего остаток борсодержащего соединения, для реализации комбинированной NO-химиотерапии и бор-нейтронозахватной терапии. Путем селективной модификации остатка Cys34 альбумина малеимидным производным флуоресцентного красителя и последующего N-гомоцистеинилирования производным тиолактона гомоцистеина, содержащим остаток клозо-додекабората, была получена наноконструкция для бор-нейтронозахватной терапии. Синтез аналога на основе природного модификатора – борсодержащего тиолактона гомоцистеина – был осуществлен путем алкилирования аминогруппы тиолактона с помощью диоксониевого производного клозо-додекабората. Постсинтетическая модификация остатков лизина белка с использованием бор-тиолактона гомоцистеина обеспечила введение в белок SH-групп и возможность последующего транс-S-нитрозилирования белка с помощью S-нитрозоглутатиона. Обнаружено, что 2 моль NO конъюгирано с 1 моль борсодержащего HSA. Продемонстрировано, что борсодержащий S-нитрозотиол на основе гомоцистеиниламида альбумина, даже без облучения эпитечловыми нейтронами, более цитотоксичен в отношении клеточных линий глиобластомы человека, чем борсодержащий конъюгат альбумина. Таким образом, использованный подход позволяет получить обогащенную атомами бора конструкцию на основе биосовместимого опухоль-специфичного белка, содержащую флуоресцентную метку и увеличенное количество S-нитрозогрупп, необходимых для проявления химиотерапевтического эффекта. Практическая значимость данной конструкции состоит в возможности ее использования в рамках воздействия на раковую опухоль, совмещающего химио- и бор-нейтронозахватную терапию.

Ключевые слова: S-нитрозоглутатион, клозо-додекаборат, борсодержащий тиолактон гомоцистеина, S-нитрозированный борсодержащий гомоцистеиниламид альбумина, бор-нейтронозахватная терапия

DOI: 10.31857/S0132342325010101, **EDN:** LYUNDQ

ВВЕДЕНИЕ

Присуждение в 1998 г. Нобелевской премии по физиологии и медицине Роберту Ф. Форчотту, Луису Игнаро и Фериду Мьюрэду за их открытия,

касающиеся оксида азота в качестве сигнальной молекулы в сердечно-сосудистой системе, подчеркнуло важность изучения проблемы функционирования NO-радикала как регулятора клеточ-

Сокращения: EPR – эффект повышенной проницаемости и удерживания; HSA – сывороточный альбумин человека; HTL – тиолактон гомоцистеина; SPARC – секреируемый кислый и богатый цистеином белок; БНЗТ – бор-нейтронозахватная терапия; ДИПЭА – дизопропилэтамин.

Автор для связи: (тел: +7 (905) 930-81-85, e-mail: v.silnikov@mail.ru).

ного и тканевого метаболизма [1]. Оксид азота, синтезируемый в различных тканях, может диффундировать через клеточные мембранны, что и обеспечивает его действие без участия клеточных рецепторов [2–4]. Однако эндогенный NO-радикал нестабилен и имеет довольно короткий период полураспада. Среди многочисленных продуктов его превращения особое место занимают пероксинитрит, нитриты, нитраты, гемовые и негемовые нитрозильные комплексы, а также нитрозотиолы [5–7]. За исключением перокси-нитрита [8], все они способны при определенных условиях выделять оксид азота в свободном виде и, таким образом, являются депо NO. Будет ли действие NO-доноров полезным или вредным для организма в целом, зависит от того, на что оно направлено. Направленность воздействия на собственные здоровые клетки организма нежелательна, т.к. может вызвать проявление побочных эффектов при терапии. Специфическое воздействие на чужеродные или на собственные нездоровье клетки (например, на раковые клетки или на микроорганизмы в крови) будет обеспечивать эффективную терапию донором оксида азота. Таким образом, стратегии использования оксида азота в качестве терапевтической молекулы требуют его направленной доставки в ткани-мишени, чтобы ограничить биоэффекты NO этой областью.

В течение многих лет в научном обществе активно шла дискуссия о том, действует ли молекула NO как противоопухолевый или канцерогенный агент. Оказалось, что оксид азота обладает способностью как оказывать противоопухолевое действие, так и стимулировать развитие опухолей [8–10]. Определение того, какой эффект будет преобладать, зависит от типа ткани, концентрации вводимого NO и микроокружения опухоли. Тем не менее эти открытия привели к широкому числу предлагаемых вариантов использования оксида азота в качестве противоракового агента, как в газовой химиотерапии, так и в комбинации с другими методами лечения [11–19].

В числе кандидатов на роль транспортера оксида азота, обеспечивающего направленную доставку в злокачественные опухоли, рассматривают сывороточный альбумин человека (HSA), являющийся одним из наиболее важных эндогенных белков для транспорта NO в крови человека [19, 20]. Было обнаружено, что S-нитрозилированный альбумин может активировать или подавлять

разнообразные биохимические и физиологические процессы, включающие многие стороны жизнедеятельности клеток и тканей [21–26]. Известно, что этот белок широко распределяется по организму как в крови, так и в различных интерстициальных жидкостях и органах. Распределение альбумина *in vivo* контролируется множественными рецепторами альбумина [27]. Рецепторы альбумина представляют собой группу разнообразных белков, таких как FcRn, gp60, мегалин, кубилин, SPARC и CD36, при этом они взаимодействуют с разными сайтами альбумина. Длительный период циркуляции (~19 сут) HSA за счет взаимодействия с рециклирующим клеточным неонатальным Fc-рецептором (FcRn), биосовместимость и отсутствие присущей большинству других систем доставки токсичности делают альбумин идеальным носителем для доставки лекарств с широким терапевтическим применением [28–30]. Аккумуляция альбумина в опухолевых клетках может быть обусловлена трансцитозом в интерстициальное пространство опухоли, который обеспечивается специфическим взаимодействием с рецептором SPARC (секретируемый кислый и богатый цистеином белок). Более того, пролонгированное время циркуляции макромолекулярных терапевтических конструкций дает возможность использовать для пассивного накопления препарата в злокачественных опухолях сосудистые дефекты солидных опухолей через феномен, известный как эффект повышенной проницаемости и удерживания (накопления) (EPR-эффект) [31–33]. В последние десятилетия EPR-эффект был признан центральной парадигмой в адресной доставке препаратов в опухоль. Благодаря этой концепции нанотехнологии достигли феноменального уровня исследований. На сегодняшний день накапливается все больше исследований, демонстрирующих, что одним из энхансеров EPR-эффекта выступает оксид азота [33–36]. Однако противоопухолевое действие NO имеет сильную концентрационную зависимость [16]. Ряд факторов, среди которых гетерогенность опухоли, усложнение в микроокружении опухоли, сложность взаимодействий между NO-радикалом и иммунной системой, а также несоответствие между лабораторными моделями и опухолями человека, в значительной степени обуславливают низкую эффективность адресной доставки в опухоль и приводят к терапевтической неудаче в клинической реализации [31, 34]. Для

решения данных проблем предлагаются использовать NO-терапию в комбинации с другими терапевтическими методами, например, лучевой, фототермической или фотодинамической терапией (рис. 1) [36–39].

Противоопухолевый механизм NO – ключ к лечению рака, а рационально спроектированные системы доставки NO, обеспечивающие высвобождение NO в необходимый момент в опухолевой ткани, имеют решающее значение для успеха биомедицинского применения NO при комбинированной терапии. Показано [39], что можно обеспечить эффективность NO-терапии через разрушение связи S–N в S-нитрозотиолах путем контролируемой дозы рентгеновского излучения. Однако широко распространенные в настоящее время фракционные рентгеновская и протонная радиотерапии отличаются тяжестью побочных эффектов. Избирательность воздействия на опухолевые клетки при этих видах радиотерапии определяется точностью физической фокусировки облучения в опухоли.

По сравнению с традиционными видами радиационной терапии с использованием рентгеновского излучения и протонных пучков, бор-

нейтронозахватная терапия (БНЗТ) обладает рядом уникальных преимуществ [40, 41]. Для проведения этой терапии пациенту вводят препарат со стабильным изотопом ^{10}B . Продукты ядерной реакции (рис. 2), ядро лития с энергией 0.84 МэВ и α -частица с энергией 1.47 МэВ, имеют малый пробег в воде или в тканях организма – 5.2 и 7.5 мкм (характерный размер клеток млекопитающих). В 6.1% случаев энергия, которая выделяется при поглощении нейтрона ядром ^{10}B , распределяется только между ядром лития и α -частицей, в 93.9% случаев ядро лития вылетает в возбужденном состоянии и испускает γ -квант с энергией 0.48 МэВ. Темп торможения γ -кванта существенно ниже – 0.3 кэВ мкм⁻¹. Таким образом, выделение основной части энергии ядерной реакции ^{10}B (n, α) ^{7}Li , а именно 84%, ограничивается размером одной клетки, и селективное накопление бора внутри клеток опухоли и последующее облучение нейтронами должны приводить к ее разрушению с относительно малыми повреждениями окружающих нормальных клеток. В случае объединения борсодержащего остатка и S-нитрозотиола в пределах одной молекулы белка можно обеспечить за счет испускания γ -кванта скоординированное разрушение связи S–N и высвобо-

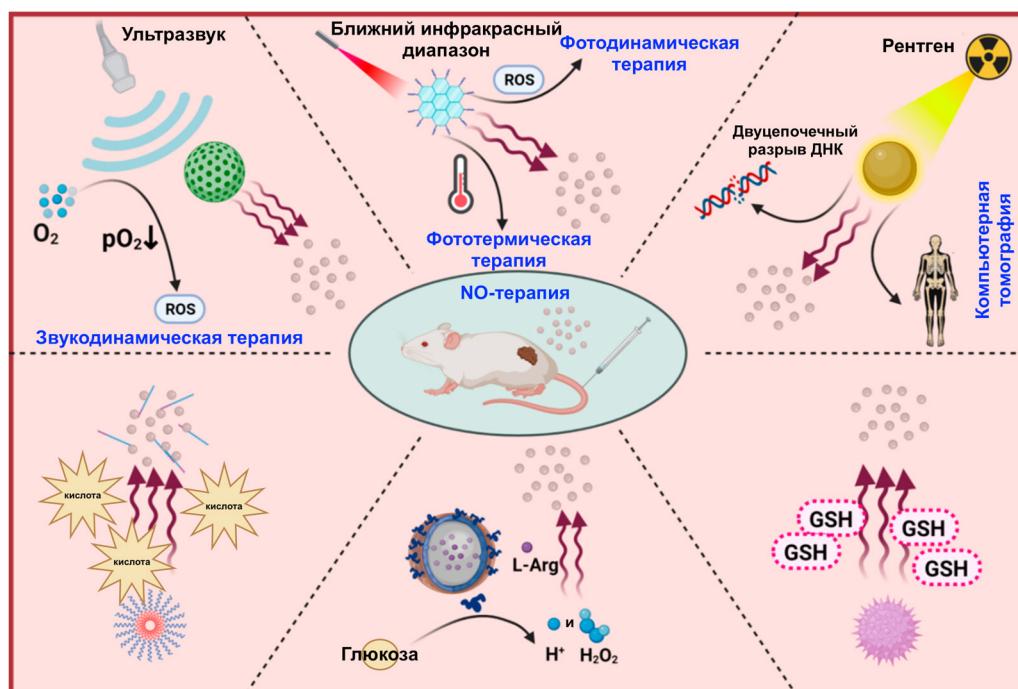


Рис. 1. Подходы к усилению эффективности NO-терапии путем воздействия экзогенных (свет, ультразвук, рентгеновские лучи) или эндогенных (глутатион, кислота, глюкоза) стимулов [37].

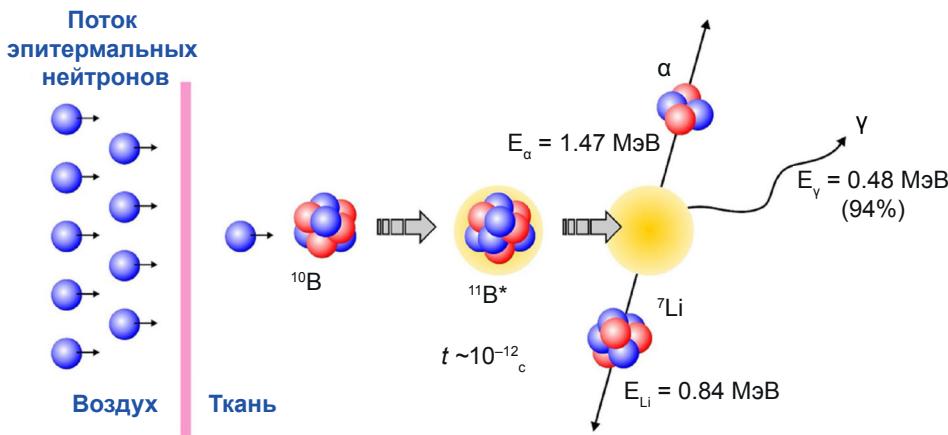


Рис. 2. Принципиальная схема БНЗТ [40].

бождение необходимого количества оксида азота в соответствии с патофизиологическими потребностями.

Цель данной работы заключалась в конструировании на основе альбумина бор-обогащенного экзогенного донора оксида азота для реализации комбинированной NO-терапии и БНЗТ. В полученную конструкцию была включена репортная группа, которая, как было показано ранее [42], способна обеспечить возможность прижизненной визуализации процесса доставки терапевтических наноконструкций в опухоль.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сывороточный альбумин человека содержит в своем составе только одну полипептидную цепь из 585 а.о., состоящую из трех гомологичных α -спиральных доменов (I, II и III) [43]. Каждый домен имеет два субдомена, обозначаемых A и B. В HSA имеется 35 остатков цистеина, 34 из которых образуют 17 дисульфидных мостиков. Известно [43], что Cys34, находящийся в субдомене IA, – это единственный остаток цистеина, сульфгидрильная группа которого не вовлечена в образование дисульфидной связи. Универсальная реакционная способность остатка Cys34 обеспечила возможность осуществлять *транс*-нитрозилирование альбумина с помощью *S*-нитрозоглутатиона [44]. Использование данного остатка для модификации белка невозможно переоценить. К сожалению, таким образом можно ввести не более одной NO-группы в белок. Более того, титрование с помощью реагента Эллмана (дитио-5,5'-бис(2-нитробензойная кислота)) указывает на

то, что в большинстве коммерческих препаратов альбумина присутствует не более 30% восстановленной формы Cys34, тогда как остальные остатки встречаются в виде либо смешанных дисульфидов, либо необратимых окисленных форм [45, 46]. Таким образом, при *S*-нитрозилировании альбумина только небольшой процент молекул белка будет содержать нитрозогруппу, но это биологическая реальность.

Ввиду наличия в молекуле альбумина большого количества первичных аминогрупп (59 остатков лизина) авторам [47, 48] удалось повысить степень модификации альбумина молекулами оксида азота (6.64 моль NO/моль HSA) путем введения в белок дополнительных сульфгидрильных групп при взаимодействии его с реагентом Траута (2-иминотиоланом). В экспериментах *in vitro* и *in vivo* был отмечен выраженный противоопухолевый эффект при использовании полученного таким способом *S*-нитрозированного альбумина.

Синтез и использование борсодержащего аналога тиолактона гомоцистеина для создания бор-обогащенного экзогенного донора оксида азота на основе альбумина. Ранее [49–53] мы сообщали об использовании другого ацилирующего агента – тиолактона гомоцистеина (циклического тиоэфира) – для обогащения молекул альбумина сульфгидрильными группами с целью последующего синтеза на основе функционализированного белка различных мультифункциональных наноконструкций для терапии рака. Используя при *N*-гомоцистеинилировании оптимальное соотношение ацилирующего реагента и молекул белка, мы посредством сайт-специфической мо-

дификации минимизировали изменение в структуре альбумина, что важно для получения препаратов с высокой противоопухолевой активностью [42, 53]. Использование тиолактона гомоцистеина (HTL) для введения в белок дополнительных сульфидрильных групп открывает поистине уникальные возможности. Благодаря присутствию в структуре HTL двух функциональных групп (аминогруппа и тиолактоновый цикл) тиолактон может реагировать как с нуклеофильными агентами (тиоэфирная группировка), так и с электрофильными реагентами (аминогруппа). Таким образом, через модификацию аминогруппы тиолактона можно получать различные производные природного модификатора, а наличие тиолактонового кольца обеспечивает возможность присоединения модифицированного остатка гомоцистеина к боковым радикалам лизина в белке [42, 49–53].

В настоящей работе мы использовали аминогруппу HTL для присоединения остатка борсодержащего соединения. Поскольку для БНЗТ критически важным является наличие значительного количества атомов бора, в качестве борсодержащих молекул для получения бор-обогащенного экзогенного донора оксида азота было выбрано производное *клозо*-додекабората, содержащее 12 атомов бора. Такого типа производные, будучи дианионами, обладают, в зависимости от катиона, хорошей растворимостью как в органических растворителях, так и в воде, что представляет собой важное синтетическое преимущество при синтезе борсодержащего аналога HTL (рис. 3, соединение HTL-B₁₂H₁₂) и последующего конъюгирования его с молекулами альбумина (рис. 4). Ранее [51, 52] было показано, что пролиферация клеток глиобластомы человека U-87MG, предварительно обработанных конъюгатом альбумина с *клозо*-додекаборатом, снижается после проведения БНЗТ. Данные сопоставимы с таковыми, полученными при инкубации клеток с борфенил-

аланином и последующем облучении. Более того, исследования *in vivo* развития глиомы у крыс после введения конъюгатов альбумина с *клозо*-додекаборатом и последующего облучения потоком эпителевых нейтронов показали замедление роста опухоли [54]. Таким образом, использование *клозо*-додекабората для получения на основе альбумина бор-обогащенного экзогенного донора оксида азота представляется перспективным.

Синтез борсодержащего аналога HTL-B₁₂H₁₂ осуществляли путем алкилирования аминогруппы тиолактона гомоцистеина (I) с помощью диксониевого производного *клозо*-додекабората (II) (рис. 3). Оксониевые соли *клозо*-додекабората получали согласно методу [55]. Ранее [56] было установлено, что такие оксониевые производные *клозо*-додекабората способны реагировать с высокими выходами с различными аминами. Выделение целевого продукта реакции из реакционной смеси проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Условия выделения и подробные характеристики целевого продукта реакции приведены в разделе “Эксперим. часть”.

Далее борсодержащее производное тиолактона было использовано в качестве функционального мостика для сайт-специфического связывания *клозо*-додекабората и оксида азота с молекулами альбумина. Реализовать уникальный потенциал альбумина для получения мультифункционального экзогенного донора NO возможно благодаря сайт-специфической модификации в отдельных модулях белка. Схема синтеза на основе альбумина бор-обогащенного экзогенного донора оксида азота, содержащего репортёрную группу, представлена на рис. 4 (путь a).

Наличие в HSA только одной свободной SH-группы в остатке Cys34 в субдомене IA позволило в настоящей работе селективно присоединить флуоресцентную метку с использованием малеимидного производного красителя (рис. 4, путь a). Известно, что малеимидные производные спо-

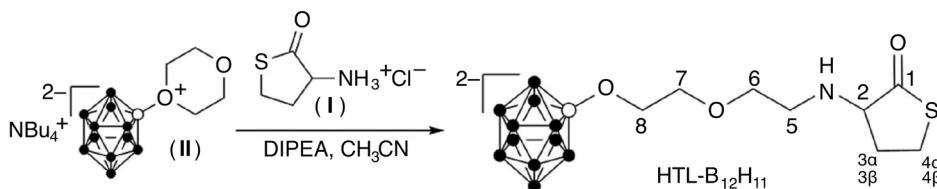


Рис. 3. Схема синтеза борсодержащего аналога тиолактона гомоцистеина (HTL-B₁₂H₁₁).

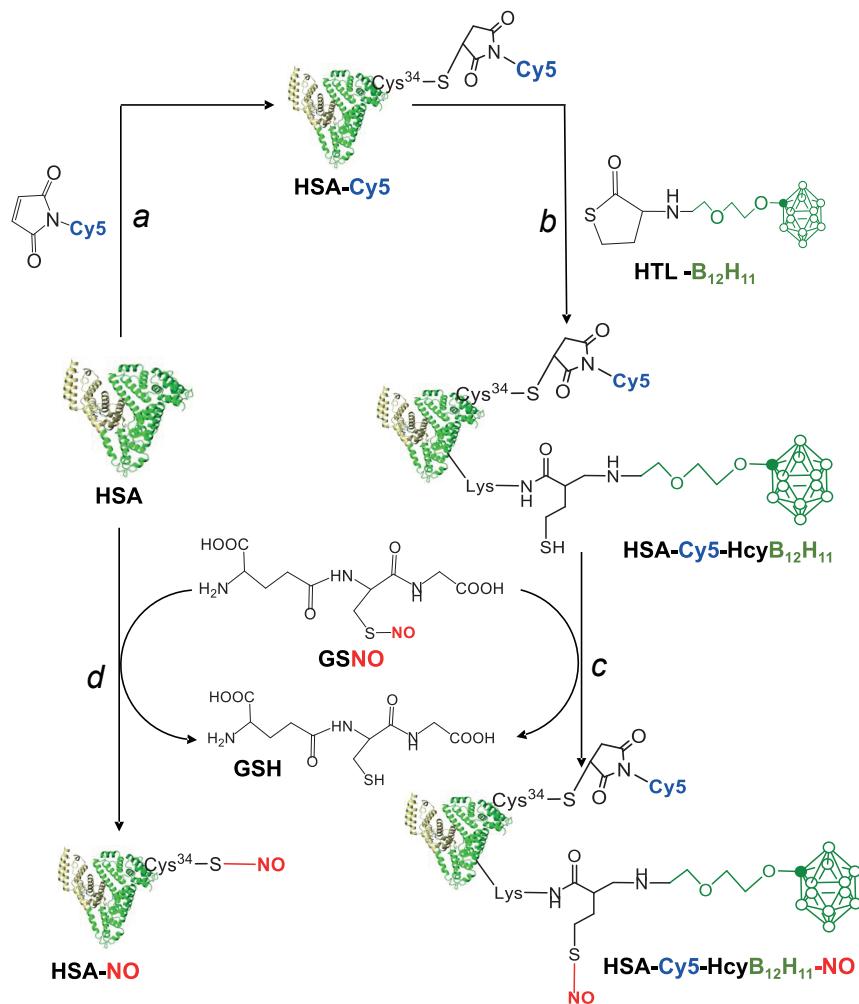


Рис. 4. Схема получения *S*-нитрозилированного борсодержащего гомоцистеиниламида альбумина, содержащего флуоресцентный краситель (пути *a*, *b* и *c*), и *S*-нитрозилированного альбумина (путь *d*).

собны взаимодействовать также с боковыми радикалами лизина [57]. Однако высокая нуклеофильность сульфидрильной группы на альбумине обеспечивает при использовании 2-кратного избытка малеимидного реагента селективность модификации только по остаткам Cys34 [50]. Таким образом, аминогруппы остатков лизина, необходимые для введения клозо-додекабората через *N*-гомоцистеинилирование белка (рис. 4, путь *b*) с использованием бор-производного тиолактона, остаются интактными.

N-Гомоцистеинилирование альбумина, содержащего флуорофор, проводили в условиях, близких к физиологическим (фосфатный буфер PBS, pH 7.4). После реакции проводили очистку модифицированного белка от низкомолекулярных соединений в центрифужных концентраторах.

Транс-нитрозилирование борсодержащего ацетамида альбумина. Для транс-нитрозилирования HSA и борсодержащего гомоцистеиниламида альбумина использовали *S*-нитрозоглутатон (рис. 4, пути *b* и *c*). *S*-Нитрозилирование проводили в условиях, близких к физиологическим (фосфатный буфер PBS, pH 7.4). После реакции проводили очистку модифицированного белка от низкомолекулярных соединений в центрифужных концентраторах.

Согласно физико-химическим характеристикам (электронная спектроскопия, масс-спектрометрия, гель-электрофорез, анализ функциональных групп), модифицированный альбумин содержит в структуре флуорофор, монооксид азота и атомы бора. По данным электронной спектроскопии (рис. 5*a*), у очищенного от низкомолекулярной фракции белкового коньюгата HSA-Cy5 наблюда-

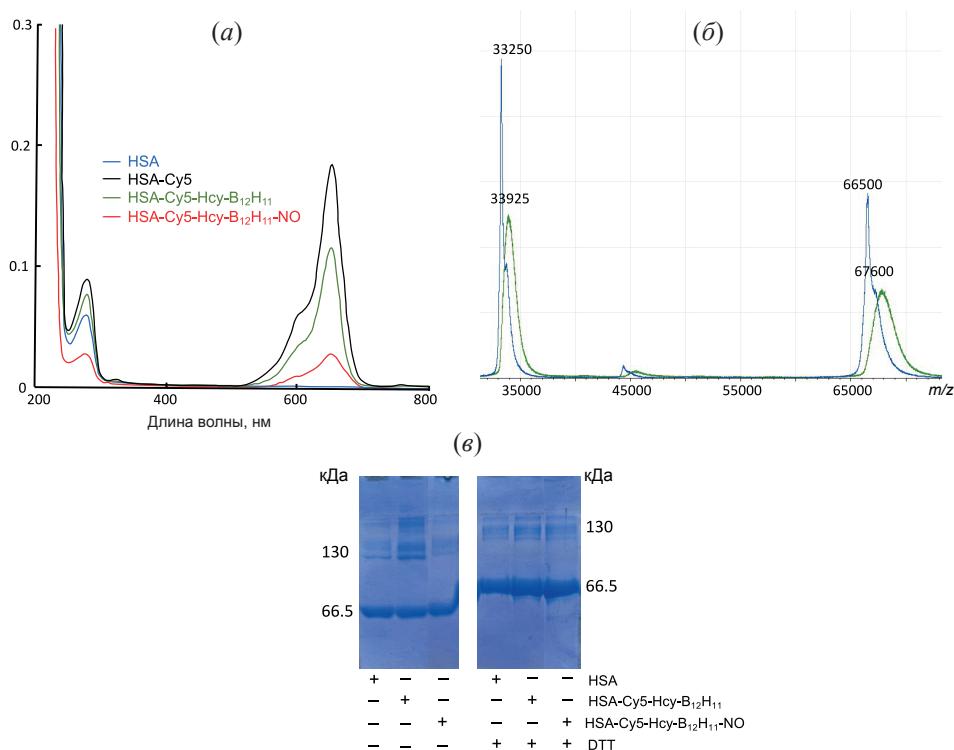


Рис. 5. Характеристики многофункциональных конъюгатов сывороточного альбумина человека. (а) – Электронные спектры поглощения HSA и его гомоцистамидов в буфере PBS, pH 7.4; (б) – MALDI-TOF-масс-спектры HSA и его гомоцистамидов; (в) – SDS-PAGE гомоцистамидных конъюгатов HSA в условиях Лэммли с последующим окрашиванием кумасси синим.

ется появление полосы поглощения на 650 нм, что соответствует наличию в его составе красителя Cy5. Расчет, проведенный с учетом коэффициентов экстинкции белка и красителя Cy5, показал степень модификации белка красителем, равную 24%, что практически соответствует количеству свободных остатков Cys34 в исходном коммерчески доступном альбумине (25%). После проведения стадии гомоцистеинилирования и обработки S-нитрозоглутатионом длинноволновое поглощение в электронных спектрах всех коньюгатов, соответствующее красителю Cy5, сохраняется (рис. 5а). Согласно данным MALDI-TOF-спектрометрии (рис. 5б), коньюгат HSA-Cy5-HcyB₁₂H₁₁ содержит в среднем 2.6 остатка HcyB₁₂H₁₁, т.к. разность масс HSA-Cy5 и HSA-Cy5-HcyB₁₂H₁₁ составляет 902 Да, а масса одного присоединенного остатка HcyB₁₂H₁₁ – 347 Да. По данным атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, с одной молекулой альбумина связывается в среднем 2.4 остатка борсадер-

жащего HTL. Было обнаружено, что 2 моль NO конъюгировано с 1 моль борсодержащего HSA.

Эксперименты *in vitro*. Противоопухолевую активность борсодержащей мультифункциональной наноконструкции оценивали *in vitro* с использованием МТТ-теста [58] (рис. 6). При обработке клеток линии T98G конъюгатом HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁-NO выживаемость клеток уменьшается в зависимости от дозы, и самое низкое значение выживаемости достигается при концентрации 40 мКМ (выживаемость 70.2%). В то же время при инкубации клеток с SNO-HSA и HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁ не выявлено значительного снижения жизнеспособности клеток по сравнению с нативным альбумином.

Полученные нами результаты представляют большой интерес для создания на основе альбумина систем доставки лекарственных препаратов для БНЗТ с контролируемой скоростью высвобождения нитрозогруппы.

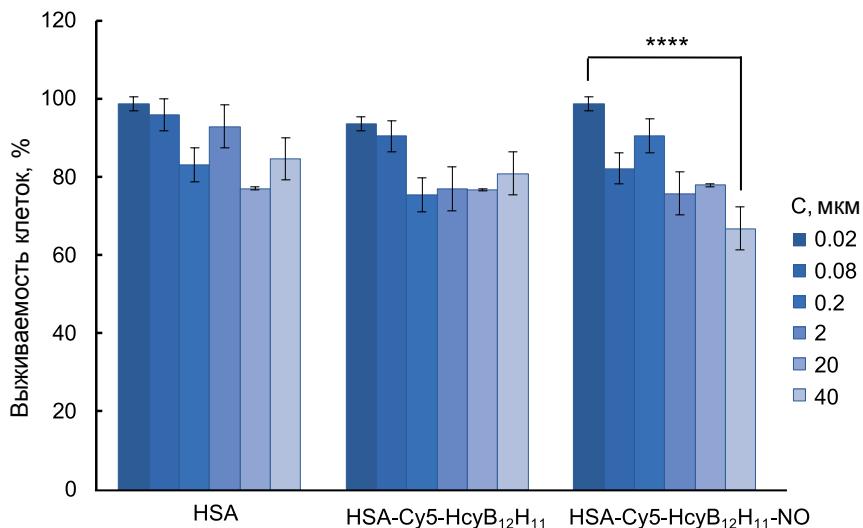


Рис. 6. Жизнеспособность клеток T98G, обработанных HSA, HSA-Cy5-HcyB₁₂H₁₁ и HSA-Cy5-HSA-Cy5-HcyB₁₂H₁₁-NO. Доза коньюгатов составляла 0.02–40 мкМ в белковом эквиваленте. Все данные представлены как среднее значение \pm SD ($n = 3$). Для сравнения более чем двух наборов данных использовали двусторонний дисперсионный анализ. **** $p \leq 0.0001$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и клеточные линии. Клеточная линия глиобластомы человека T98G была приобретена в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Реагенты и материалы были приобретены у Sigma-Aldrich (США) и Reached (Россия), если не указано иное. Сульфо-Су5-малеимид приобретен у Lumiprobe (Россия). L-глутатион восстановленный приобретен у Renal (Венгрия). Во всех экспериментах использовали воду Milli-Q с проводимостью $>18\text{ M}\Omega/\text{см}$. Использовали фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS) (10 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KН₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, pH 7.4 (Amresco, США). Органические растворители высушивали и очищали с помощью стандартных процедур.

Диоксониевое производное клозо-додекабората было любезно предоставлено сотрудниками ЛОрС ИХБФМ СО РАН.

В работе использовали свободный от глобулинов и жирных кислот сывороточный альбумин человека (кат. № A3782, Sigma-Aldrich, США).

Остальные химические реактивы были получены из коммерческих источников и использованы без предварительной очистки.

Физико-химические методы. Электронные спектры поглощения получали на спектрометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Концентрации растворов альбумина определяли методом поглощения при 278 нм, pH 7.4, используя молярный коэффициент экстинкции в PBS $\epsilon = 3.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [59]. Концентрации растворов коньюгатов альбумина, содержащих флуоресцентный краситель Су5, определяли спектрофотометрическим методом на длине волны 650 нм, pH 7.4, используя молярный коэффициент экстинкции красителя $\epsilon = 6.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Спектры поглощения растворов регистрировали 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). ¹³C-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре DRX-500 (Bruker, Германия; рабочая частота 125.7 МГц). Все химические сдвиги в спектрах ¹³C-ЯМР оценивали относительно растворителей: ацетона-*d*₆, ацетонитрила, хлороформа-*d*₃ и DMSO-*d*₆. ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре AV-400 (Bruker, Германия; рабочая частота 400.0 МГц), сигналы оценивали относительно растворителей хлороформа-*d*₃ и DMSO-*d*₆. Кратность каждого сигнала обозначена следующим образом: с – синг-

лет, д – дублет, дд – дублет дублетов, т – триплет, к – квадруплет, м – мультиплет.

MALDI-TOF-масс-спектры белков регистрировали на масс-спектрометре Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия) MALDI-TOF в положительном линейном режиме. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту. Образцы белка обессоливали наконечниками ZipTip C4. Масс-спектры получали путем усреднения 3000 лазерных снимков. Внешнюю калибровку обеспечивали с помощью HSA (m/z 66 500 Да, $[M + H]^+$).

ESI-масс-спектры регистрировали на приборе ESI MSD XCT Ion Trap (Agilent Technologies, США) в негативной моде.

ИК-спектры регистрировали на Фурье-ИК-спектрометре 640-IR (Varian, США) в диапазоне 4000–400 cm^{-1} в сухом KBr.

Электрофоретический анализ HSA и его коньюгатов проводили по методу Лэммли [60]. Гель окрашивали 0.1% Кумасси CBB G-250. Электрофотограммы количественно анализировали с использованием программы Gel Analyzer 2010 (<http://www.gelanalyzer.com/>).

Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) для определения содержания бора в полученных белковых коньюгатах была проведена на спектрометре высокого разрешения ICPE-9820 (Shimadzu, Япония) А.И. Касатовой (Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН).

Тонкослойную хроматографию выполняли на пластинах DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) в хлористом метилене. Пластины TCX анализировали окрашиванием в иодной камере, нингидрином и 23 mM раствором PdCl_2 в 0.5 M растворе HCl.

Очистку белковых коньюгатов проводили с помощью ультрафильтрационных центриконов объемом 0.5 мл (Amicon Centriprep YM 30, Millipore, Великобритания), пропускающих молекулы с молекулярной массой <3000 Да. Промывали 20%-ным (v/v) раствором DMSO в PBS порциями по 400 мкл, суммарно 10 объемами реакционной смеси, и далее – PBS такими же порциями, пятью объемами реакционной смеси.

Синтетические методики. Синтез S-нитрозоглутатиона был адаптирован согласно методике [61]. К перемешиваемому при охлаждении

на льду раствору глутатиона (0.165 г, 0.5 ммоль) в воде (0.862 мл), содержащему 2 N HCl (0.216 мл), добавляли нитрит натрия (0.037 г, 0.5 ммоль). К розовому раствору через 40 мин при 5°C добавляли ацетон (1 мл) и перемешивали еще 10 мин, после чего оставляли в морозильной камере на ночь. Образовавшийся мелкодисперсный осадок бледно-красного цвета отфильтровывали, промывали последовательно 3 раза охлажденным ацетоном (по 1 мл) и 3 раза охлажденной до 5°C водой (по 1 мл). Полученное вещество оставляли сушиться в экскаторе с CaCl_2 на ночь. Выход S-нитрозоглутатиона составил 40.67%. ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 1.84–1.98 (2H, уш. м, J 7.329, 7.057, H-2), 2.09 (1H, с., H-2), 2.17–2.25 (2H, т., J 7.329, H-3), 2.26–2.38 (2H, м., J 8.143, H-3), 2.71–2.79 (2H, дд., J 8.305, H-5), 3.05–3.12 (2H, дд., J 8.305, H-5), 3.51–3.64 (1H, м., J 7.057, 7.833, H-1), 3.65–3.84 (2H, д., J 9.438, H-6), 3.85–3.99 (1H, уш. с., H-5), 4.38–4.46 (1H, уш. с., H-4). ^{13}C -ЯМР (75.43 МГц, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$): 26 (1C, с., C-3, CH_2), 32 (1C, с., C-4, CH_2), 42 (1C, с., C-9, CH_2), 54 (1C, с., C-2, CH), 55 (1C, с., C-6, CH), 172 (1C, с., C-7, CH_2S), 173 (2C, с., C-5, 8 C=ONH₂), 174 (2C, с., C-1, 10 CO₂H).

Синтез производного тиолактона гомоцистеина, содержащего клозо-додекаборат (HTL-B₁₂H₁₁). К раствору гидрохлорида HTL (61.4 мг, 0.4 ммоль) в сухом CH_3CN (1.85 мл) добавляли DIPEA (76.8 мкл, 0.44 ммоль) и раствор диоксоневого производного клозо-додекабората (94.5 мг, 0.2 ммоль) в сухом CH_3CN (462 мкл). Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию контролировали с помощью TCX (элюент CH_2Cl_2), как описано выше. Далее реакционную смесь концентрировали до 300 мкл на ротационном испарителе. Продукт реакции очищали на стеклянной колонке (длина 12 см, диаметр 1 см) с силикагелем (0.04–0.063 мм, Macheney-nagel). В качестве элюента использовали CH_2Cl_2 с градиентом концентрации CH_3OH от 0 до 100% за 1.5 ч. Фракции собирали и анализировали методом TCX. Выход HTL-B₁₂H₁₁ составил 30%. TCX (CH_2Cl_2): $R_f = 0.38$. ^1H -ЯМР (хлороформ- d_3): 4.26 (дд, 1H, 2-H, $J_{23} = 7$, $J_{23} = 12.8$); 3.93 (м, 2H, 6-H); 3.53–3.66 (м, 3H, CH_2 , ДИПЭА); 3.42 (м, 1H, 4 α -H); 3.06–3.17 (м, 3H, CH_2 , ДИПЭА); 2.77 (м, 2H, 5-H); 2.12 (м, 3H, CH_2 , м, 1H, 3 α -H); 1.93 (м, 3H, CH_2 , м, 1H, 3 β -H); 1.35–1.45 (м, 15H, CH_2 , ДИПЭА); 0.75–0.9 (м, 11H, B-H). ^{13}C -ЯМР (ацетон- d_6 + CD_3CN): 204.08 (с, 1C, 1-C), 80.48 (с, 1C, 2-C), 72.84 (с, 1C, 7-C),

72.46 (с, 1C, 6-C), 71.41 (с, 1C, 8-C), 44.15 (с, 1C, 5-C), 30.85 (с, 1C, 4-C), 24.12 (с, 1C, 3-C). ИК-спектроскопия: В–Н 2480 cm^{-1} , С=О 1700 cm^{-1} , В–О 1290 cm^{-1} . ESI в отрицательной моде: рассчитано для $[\text{C}_8\text{O}_3\text{SNB}_{12}\text{H}_{25} + \text{H}]^-$ 348, обнаружено 348; рассчитано для $[\text{C}_8\text{O}_3\text{SNB}_{12}\text{H}_{25}^{3-} + 2\text{K}^+]^-$ 426, обнаружено 427.

Синтез HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁. Синтез HSA-Су5 и N-гомоцистеилирование белка осуществляли согласно методике [62]. Растворы белка HSA-Су5 в буфере PBS (0.84 мМ, 0.931 мл, 0.78 мкмоль) смешивали с производным HTL-B₁₂H₁₁ в DMSO (0.125 М, 0.05 мл, 5.04 мкмоль). Соотношение PBS и DMSO в реакционной смеси было 20 : 1 (v/v). Реакцию проводили в течение 42 ч при 37°C. Очистку итогового коньюгата осуществляли с помощью ультрафильтрационных пробирок Millipore. Выход HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁ составил 89.5%. УФ-спектр (PBS-буфер, pH 7.4): $\lambda_{\max} = 278 \text{ нм}$ ($\epsilon = (4.7 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), $\lambda_{\max} = 650 \text{ нм}$ ($\epsilon = (6.5 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). MALDI-TOF, m/z : рассчитанное значение M_w HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁ 67.039 Да: 66 500 Да (HSA) + 192 Да (0.25 Су5) + 347 (НсуB₁₂H₁₁). Измеренное значение M_w HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁ 67 600 Да, соответствует присоединению 2.6 остатков НсуB₁₂H₁₁ на молекулу белка. АЭС-ИСП: 2.4 остатка НсуB₁₂H₁₁ на молекулу альбумина.

Нитрозилирование Нсу-HSA и альбумина S-нитрозоглутатионом. При нитрозилировании использовали 0.3 мМ растворы белковых образцов (HSA или HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁) в смеси PBS : DMSO с содержанием DMSO 20%. Использовали пятикратный избыток S-нитрозоглутатиона по отношению к количеству SH-групп на белковом образце. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 18 ч при перемешивании. За ходом реакции следили по уменьшению интенсивности полосы S-нитрозоглутатиона (334 нм) в спектрах поглощения реакционных смесей. Процесс завершали после того, как интенсивность поглощения переставала меняться. После инкубации S-нитрозилированные белки очищали от низкомолекулярных продуктов реакции методом ультрацентрифугирования на мембранах Centricon Amicon Ultra 3K (Millipore, США). В качестве элюента использовали раствор 10%-ного DMSO в PBS.

Количество NO на белковых образцах. В одну порцию раствора белкового образца (HSA-

Су5-НсуB₁₂H₁₁-NO или HSA-NO) в ацетатном буфере (pH 2.5; концентрация образца по белку 2.0×10^{-6} М; 1 мл) добавляли раствор сульфаниловой кислоты в 4×10^{-4} М соляной кислоте (3.5×10^{-2} М, 0.2 мл). Во вторую порцию такого же раствора добавляли смесь сульфаниловой кислоты и ацетата ртути(II) в 4×10^{-4} М соляной кислоте (0.2 мл; концентрация сульфаниловой кислоты 3.5×10^{-2} М; концентрация ацетата ртути(II) 7.4×10^{-3} М). Полученные смеси выдерживали в темноте 3 мин, после этого к ним добавляли раствор нафтилэтиленамина в 4×10^{-4} М соляной кислоте (2.5×10^{-2} М; 0.05 мл). Полученные смеси выдерживали в темноте в течение 35 мин. В качестве контроля использовали аналогичные смеси с HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁. Количество оксида азота(II) было определено спектрофотометрически на длине волны 540 нм. Для калибровки использовали раствор нитрита натрия с концентрациями 0.0 М, 0.8×10^{-6} М, 1.6×10^{-6} М, 2.4×10^{-6} М, 3.2×10^{-6} М, 4.0×10^{-6} М.

По итогам измерений было обнаружено, что 2 моль NO коньюгировано с 1 моль борсодержащего HSA, а в случае HSA в среднем 0.5 моль NO коньюгировано с 1 моль борсодержащего HSA.

Анализ жизнеспособности клеток (MTT-тест). Влияние модифицированных образцов белка проводили с помощью MTT-теста на клеточных линиях глиомы человека T98G [58]. 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 ч. После этого их обрабатывали средой, содержащей альбумин или его коньюгаты (HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁ или HSA-Су5-HSA-Су5-НсуB₁₂H₁₁-NO). Концентрации коньюгатов находились в диапазоне 0.02–40 мкМ по содержанию белка. Обработку проводили при 37°C в течение 72 ч. После этого добавляли MTT до концентрации 0.5 мг/мл. После инкубации при 37°C 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, США) с пиком поглощения при 570 нм. В качестве базовой линии использовали интенсивность поглощения при 620 нм. Для каждого образца белка проводили три незави-

симальных теста. Данные представлены как средние значения со стандартными отклонениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование тиолактона гомоцистеина для введения в белок дополнительных сульфогидрильных групп открывает поистине уникальные возможности. Благодаря присутствию в структуре тиолактона двух функциональных групп (аминогруппа и тиолактоновый цикл) он может реагировать как с нуклеофильными агентами (тиоэфирная группировка), так и с электрофильными реагентами (аминогруппа). Таким образом, через модификацию аминогруппы тиолактона можно получать различные производные природного модификатора, а наличие тиолактонового кольца обеспечивает возможность присоединения модифицированного остатка гомоцистеина к боковым радикалам лизина в белке. В результате реакции алкилирования аминогруппы тиолактона гомоцистеина диоксонием производным *клозодекабората* нами получен новый активированный тиоэфир гомоцистеина, содержащий атомы бора. Установлено, что в ходе синтеза производного тиолактона гомоцистеина не происходит разрушение γ -лактамного кольца ацилирующего агента. С его использованием путем *N*-гомоцистеинилирования синтезирован конъюгат сывороточного альбумина человека, в котором борсодержащий остаток гомоцистеина и белок связаны устойчивой амидной связью.

Для *транс*-нитрозилирования борсодержащего гомоцистеиниламида альбумина был использован *S*-нитрозоглутатион. Обнаружено, что 2 моль NO конъюгировано с 1 моль борсодержащего HSA, в то время как при модификации нативного белка с 1 моль альбумина связывается только 0.5 моль монооксида азота. Используя при *N*-гомоцистеинилировании оптимальное соотношение ацилирующего реагента и молекул белка, мы посредством сайт-специфической модификации минимизировали изменение в структуре альбумина, что важно для получения препаратов с высокой противоопухолевой активностью. Было продемонстрировано, что борсодержащий *S*-нитрозотиол на основе гомоцистеиниламида альбумина, даже без облучения эпителовыми нейтронами, более цитотоксичен в отношении клеточных линий глиобластомы человека, чем борсодержащий конъюгат альбумина. Разработанный бор-обогащенный экзогенный донор оксида азота содержит

репортерную группу, введенную по остатку Cys34, которая способна обеспечить возможность прижизненной визуализации процесса доставки терапевтической наноконструкции в опухоль.

HSA – наиболее распространенный транспортный белок в плазме, в последнее время широко используемый для создания противоопухолевых наноконструкций. Основные причины выбора данного белка в качестве транспортера лекарственных препаратов в раковые клетки – его биосовместимость, биоразлагаемость и неиммуногенность. Альбумин проявляет активное нацеливание на опухоль посредством взаимодействия с белками gp60 и SPARC (секретируемый кислый и богатый цистеином белок), распространенными в опухолеассоциированных эндотелиальных клетках и микрораковинами опухоли. Полученные нами результаты представляют большой интерес для создания на основе альбумина систем доставки лекарственных препаратов для БНЗТ с контролируемой скоростью высвобождения нитрозогруппы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центр масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Химического исследовательского центра коллективного пользования СО РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование поддержано в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равнозначенный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lancaster J.R. // Biochem. Pharmacol. 2020. V. 176. P. 113793.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113793>
2. Lundberg J.O., Weitzberg E. // Cell. 2022. V. 185. P. 2853–2878.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.010>
3. Kannan M.S., Guiang S., Johnson D.E. // Indian J. Pediatr. 1998. V. 65. P. 333–345.
<https://doi.org/10.1007/BF02761123>
4. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. // Pharmacol. Rev. 1991. V. 43. P. 109–142.
5. Thomas D.D., Liu X., Kantrow S.P., Lancaster J.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 355–360.
<https://doi.org/10.1073/pnas.011379598>
6. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. // Усп. биол. химии. 2007. Т. 47. С. 259–292.
7. Ванин А.Ф. // Мол. биология. 2023. Т. 57. С. 925–937.
8. Sharma V., Fernando V.R., Letson J., Walia Y., Zheng X., Fackelman D., Furuta S. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 4600.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094600>
9. Soni Y., Softness K., Arora H., Ramasamy R. // Am. J. Mens. Health. 2020. V. 14. P. 1557988320903191.
<https://doi.org/10.1177/1557988320903191>
10. Kamm A., Przychodzen P., Kuban-Jankowska A., Jacewicz D., Dabrowska A.M., Nussberger S., Wozniak M., Gorska-Ponikowska M. // Nitric Oxide. 2019. V. 93. P. 102–114.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.005>
11. Mintz J., Vedenko A., Rosete O., Shah K., Goldstein G., Hare J.M., Ramasamy R., Arora H. // Vaccines (Basel). 2021. V. 9. P. 94.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9020094>
12. Andrabí S.M., Sharma N.S., Karan A., Shahriar S.M.S., Cordon B., Ma B., Xie J. // Adv. Sci. (Weinh). 2023. V. 10. P. e2303259.
<https://doi.org/10.1002/advs.202303259>
13. Gao D., Asghar S., Hu R., Chen S., Niu R., Liu J., Chen Z., Xiao Y. // Acta. Pharm. Sin. B. 2023. V. 13. P. 1498–1521.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.11.016>
14. Huang W., Zhang J., Luo L., Yu Y., Sun T. // ACS Biomater. Sci. Eng. 2023. V. 9. P. 139–152.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c01247>
15. Alimoradi H., Greish K., Barzegar-Fallah A., Alshaibani L., Pittalà V. // Int. J. Nanomedicine. 2018. V. 20. P. 7771–7787.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S187089>
16. Ishima Y., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M. // Biomed. Res. Int. 2013. V. 2013. P. 353892.
<https://doi.org/10.1155/2013/353892>
17. Sinha B.K. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 13611.
<https://doi.org/10.3390/ijms241713611>
18. Zhao Z., Shan X., Zhang H., Shi X., Huang P., Sun J., He Z., Luo C., Zhang S. // J. Controll. Releas. 2023. V. 362. P. 151–169.
19. Kim J., Thomas S.N. // Pharmacol. Rev. 2022. V. 74. P. 1146–1175.
<https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000500>
20. Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J., Simon D.I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C.R., Loscalzo J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 7674–7677.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7674>
21. Tsiontsioura M., Cvirk G., Schlagenhauf A., Haidl H., Zischmeier K., Janschitz N., Koestenberger M., Wonisch W., Paar M., Wagner T., Weiss E.C., Hallström S. // Biomedicines. 2022. V. 10. P. 649.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10030649>
22. Rungatscher A., Hallstrom S., Linardi D., Milani E., Gasser H., Podesser B.K., Scarabelli T.M., Luciani G.B., Faggian G. // J. Heart Lung Transplant. 2015. V. 34. P. 479–488.
23. Hallstrom S., Franz M., Gasser H., Vodrazka M., Sembroth S., Losert U.M., Haisjackl M., Podesser B.K., Malinski T. // Cardiovasc. Res. 2008. V. 77. P. 506–514.
24. Hallstrom S., Gasser H., Neumayer C., Fugl A., Nanobashvili J., Jakubowski A., Huk I., Schlag G., Malinski T. // Circulation. 2002. V. 105. P. 3032–3038.
25. Enayati M., Schneider K.H., Almeria C., Grasl C., Kaun C., Messner B., Rohringer S., Walter I., Wojta J., Budinsky L., Walpot B.H., Schima H., Kager G., Hallström S., Podesser B.K., Bergmeister H. // Acta Biomaterialia. 2021. V. 134. P. 276–288.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.07.048>
26. Schaefer A.-K., Kiss A., Oszwald A., Nagel F., Acar E., Aliabadi-Zuckermann A., Hackl M., Zuckermann A., Kain R., Jakubowski A., Ferdinand P., Hallström S. // Transpl. Int. 2022. V. 35. P. 10057.
<https://doi.org/10.3389/ti.2022.10057>
27. Ishima Y., Maruyama T., Otagiri M., Chuang V.T.G., Ishida T. // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2022. V. 70. P. 330–333.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c21-01024>
28. Ishima Y., Maruyama T., Otagiri M., Ishida T. // Chem. Pharm. Bull. 2020. V. 68. P. 583–588.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c20-00026>
29. Bihari S., Bannard-Smith J., Bellomo R. // Crit. Care Resusc. 2020. V. 22. P. 257–265.
[https://doi.org/10.1016/S1441-2772\(20\)00394-0](https://doi.org/10.1016/S1441-2772(20)00394-0)
30. Ishima Y. // Biol. Pharm. Bull. 2017. V. 40. P. 128–134.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00867>
31. Maeda H. // J. Pers. Med. 2021. V. 11. P. 229.
32. Fang J. // J. Pers. Med. 2022. V. 12. P. 95.
33. Zi Y., Yang K., He J., Wu Z., Liu J., Zhang W. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2022. V. 188. P. 114449.

34. Kim J., Cho H., Lim D.K., Joo M.K., Kim K. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 10082. <https://doi.org/10.3390/ijms241210082>
35. Subhan M.A., Parveen F., Filipczak N., Yalamarty S.S.K., Torchilin V.P. // J. Pers. Med. 2023. V. 13. P. 389. <https://doi.org/10.3390/jpm13030389>
36. Xu Y., Ren H., Liu J., Wang Y., Meng Z., He Z., Miao W., Chen G., Li X. // Nanoscale. 2019. V. 11. P. 5474–5488.
37. Zhao Y., Ouyang X., Peng Y., Peng S. // Pharmaceutics. 2021. V. 13. P. 1917. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics1311191>
38. Ji P., Yang K., Xu Q., Qin G., Zhu Q., Qian Y., Yao W. // Pharmaceuticals (Basel). 2023. V. 16. P. 1394. <https://doi.org/10.3390/ph16101394>
39. Fan W., Bu W., Zhang Z., Shen B., Zhang H., He Q., Ni D., Cui Z., Zhao K., Bu J., Du J., Liu J., Shi J. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2015. V. 54. P. 14026–14030. <https://doi.org/10.1002/anie.201504536>
40. Barth R.F., Zhang Z., Liu T. // Cancer Commun. 2018. V. 38. P. 36.
41. Иванов А.А., Смирнов А.Н., Таскаев С.Ю., Баянов Б.Ф., Бельченко Ю.И., Давыденко В.И., Дунаевский А., Емелев И.С., Касатов Д.А., Макаров А.Н., Микенс М., Куксанов Н.К., Попов С.С., Салимов Р.А., Санин А.Л., Сорокин И.Н., Сычева Т.В., Щудло И.М., Воробьев Д.С., Черепков В.Г., Фадеев С.Н. // Усп. физ. химии. 2022. Т. 192. С. 894–912.
42. Popova T.V., Pyshnaya I.A., Zakharova O.D., Akulov A.E., Shevelev O.B., Poletaeva J., Zavjalov E.L., Silnikov VN., Ryabchikova E.I., Godovikova T.S. // Biomedicines. 2021. V. 9. P. 1–15.
43. Peters T.J. // Adv. Protein Chem. 1985. V. 37. P. 161–245.
44. Ishima Y., Hiroyama S., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Sawa T., Akaike T., Kai T., Otagiri M. // Nitric Oxide. 2010. V. 23. P. 121–127.
45. Era H., Terada S., Minami T., Takahashi T., Arikawa T. // Heterogeneity of Commercially Available Human Serum Albumin Products: Thiol Oxidation and Protein Carbonylation. 37th Congress of IUPS. Birmingham, UK, 2013.
46. Miyamura S., Imafuku T., Anraku M., Taguchi K., Yamasaki K., Tominaga Y., Maeda H., Ishima Y., Watanabe H., Otagiri M., Maruyama T. // J. Pharm. Sci. 2016. V. 105. P. 1043–1049.
47. Xu Y., Liu J., Liu Z., Chen G., Li X., Ren H. // Int. J. Nanomedicine. 2021. V. 16. P. 2597–2613. <https://doi.org/10.2147/IJN.S295445>
48. Ikeda M., Ishima Y., Chuang V.T.G., Ikeda T., Kinoshita R., Watanabe H., Ishida T., Otagiri M., Maruyama T. // Nitric Oxide. 2017. V. 69. P. 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.04.005>
49. 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. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 3925–3930.
50. 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. // RSC Medicinal Chemistry. 2020. V. 11. P. 1314–1325.
51. 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. // Molecules. 2023. V. 28. P. 2672–2689.
52. Popova T.V., Dymova M.A., Koroleva L.S., Zakharova O.D., Lisitskiy V.A., Raskolupova V.I., Sycheva T.V., Taskaev S.Y., Silnikov V.N., Godovikova T.S. // Molecules. 2021. V. 26. P. 6537–6553.
53. 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. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018. V. 28. P. 260–264. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.12.061>
54. Kashiwagi H., Kawabata S., Yoshimura K., Fukuo Y., Kanemitsu T., Takeuchi K., Shiba H., Hiramatsu R., Nishimura K., Kawai K., Takata T., Tanaka H., Watanabe T., Suzuki M., Miyatake S.I., Nakamura H., Wanibuchi M. // Investigat. New Drugs. 2022. V. 40. P. 255–264.
55. Sivaev I.B., Kulikova N.Y., Nizhnik E.A., Vichuzhanin M.V., Starikova Z.A., Semioshkin A.A., Bregadze V.I. // J. Organomet. Chem. 2008. V. 693. P. 519–525.
56. Semioshkin A., Nizhnik E., Godovikov I., Starikova Z., Bregadze V. // J. Organomet. Chem. 2007. V. 692. P. 4020–4028.
57. Kikuchi S., Kanoh D., Sato S., Sakurai Y., Suzuki M., Nakamura H. // J. Control. Release. 2016. V. 237. P. 160–166.
58. Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63.
59. Peters R.A. // In: Advances in Enzymology / Eds. Nord F.F. Interscience Publishers Inc., Geneva, Switzerland, 1957. P. 113–159.
60. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
61. Terance W. // Tetrahedron Letters. 1985. V. 26. P. 2013–2016.
62. Chubarov A.S., Zakharova O.D., Koval O.A., Romanchenko A.V., Akulov A.E., Zavjalov E.L., Razumov I.A., Koptyug I.V., Knorre D.G., Godovikova T.S. // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 6943–6954.

Preparation of Boron-Containing *S*-Nitrosothiol Based on Homocysteinylamides of Human Serum Albumin for Combined NO-Chemical and Boron-Neutron-Capture Therapy

T. V. Popova*, **, M. Van**, T. N. Kurochkin**, S. A. Tsyrempilov**, O. D. Zakharova*,
V. N. Silnikov*, #, and T. S. Godovikova*, **

* Phone: +7 (905) 930-81-85, e-mail: v.silnikov@mail.ru

* Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

** Novosibirsk National Research State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

The strategic aim of this work is to create a fluorophore-labelled, clinically relevant exogenous NO donor carrying a boron-containing compound residue on the basis of human serum albumin (HSA) for the implementation of combined NO-chemotherapy and boron-neutron-capture therapy. By selective modification of the Cys34 residue of albumin with a maleimide derivative of a fluorescent dye and subsequent *N*-homocysteinylation with a thiolactone derivative of homocysteine containing a *clozo*-dodecaborate residue, a nanoconstruct for boron-neutron-capture therapy was obtained. An analogue based on the natural modifier, boron-containing homocysteine thiolactone, was synthesised by alkylation of the amino group of thiolactone with a dioxonium derivative of *clozo*-dodecaborate. Post-synthetic modification of the lysine residues of the protein using the boron thiolactone of homocysteine provided the introduction of SH groups into the protein and the possibility of subsequent *trans-S*-nitrosylation of the protein using *S*-nitrosoglutathione. It was found that 2 mol of NO was conjugated to 1 mol of boron-containing HSA. Boron-containing *S*-nitrosothiol based on albumin homocysteinylamide, without epithermal neutron irradiation, was demonstrated to be more cytotoxic against human glioblastoma cell lines than the boron-containing albumin conjugate. Thus, the approach used allows obtaining a boron-enriched structure based on a biocompatible tumor-specific protein, containing a fluorescent label and an increased number of *S*-nitroso groups. It is necessary for the manifestation of a chemotherapeutic effect of the construct. The practical significance of this structure lies in the possibility of a cancer treating, combining chemo- and boron-neutron capture therapy.

Keywords: *S*-nitrosoglutathione, *clozo*-dodecaborate, boron-containing homocysteine thiolactone, *S*-nitrosylated boron-containing homocysteinylamide albumin, boron-neutron-capture therapy