



УДК 577.112.4;54.052

ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ БОРСОДЕРЖАЩИЕ ГОМОЦИСТЕИНАМИДЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

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

* Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

** Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

*** Институт ядерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 11

Поступила в редакцию 22.10.2024 г.

После доработки 12.11.2024 г.

Принята к публикации 14.11.2024 г.

Сочетание бор-нейтронозахватной терапии и химиотерапии может обеспечить высокую эффективность лечения раковых опухолей. Создание терапевтических конструкций, совмещающих в себе две эти функции – возможность визуализации *in vitro* и *in vivo* и удобную платформу селективной доставки в опухоль, – крайне актуально на сегодняшний день. В данном исследовании мы сосредоточились на сывороточном альбумине человека, хорошо известной платформе доставки лекарств, и разработали на его основе конструкции, функционализированные кластерами бора, аналогами химиотерапевтической молекулы – гемцитабина и сигнальными молекулами. Для создания конструкций нами были разработаны новые аналоги тиолактона гомоцистеина, содержащие клозо-додекаборат, или *бис*(дикарболид) кобальта, и аналог гемцитабина, содержащий клозо-додекаборат, присоединенный к C5-атому углерода азотистого основания. Продемонстрировано, что добавление в структуру конъюгатов гемцитабиновых аналогов повышает их цитотоксичность в отношении клеточных линий глиобластомы человека. Среди итоговых конъюгатов наибольшей цитотоксичностью обладает конструкция, имеющая в своем составе *бис*(дикарболид) кобальта. Итоговые конструкции хорошо накапливаются в цитоплазме раковых клеток. Конъюгат альбумина, имеющий в своем составе *бис*(дикарболид) кобальта и борсодержащий аналог гемцитабина, способен накапливаться в ядрах клеток линии T98G. Таким образом, в экспериментах *in vitro* обе итоговые конструкции на основе альбумина показали достаточную эффективность в отношении линии клеток глиомы человека. Мы ожидаем, что сконструированные нами терапевтические конъюгаты значительно увеличат цитотоксичность в отношении раковых клеток при облучении эпителизовыми нейтронами. Совмещение в составе одной конструкции химиотерапевтического остатка и борсодержащей группы дает в перспективе возможность для проведения более эффективной терапии глиом.

Ключевые слова: терапии на основе борированного альбумина, борсодержащие аналоги гемцитабина, борсодержащие аналоги тиолактона гомоцистеина, бор-нейтронозахватная терапия, средства доставки бора

DOI: 10.31857/S0132342325010113, **EDN:** LYTSFQ

ВВЕДЕНИЕ

Агрессивная и рецидивирующая природа глиобластомы многофакторная, это объясняется биологической гетерогенностью глиобластомы, дисфункциональными метаболическими сиг-

нальными путями, жестким гематоэнцефалическим барьером, присущей ей устойчивостью к стандартной терапии. Это происходит из-за того, что клетки глиомы имеют свойства стволовых клеток. Глиома обладает иммunoисупрессивным

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; DAPI – 4',6-диамино-2-фенилиндол; HSA – сывороточный альбумин человека; HTL – тиолактон гомоцистеина; GC – гемцитабин; SPARC – секреируемый кислый и богатый цистеином белок; БНЗТ – бор-нейтронозахватная терапия; ДИПЭА – диизопропилэтиламин.

Автор для связи: (тел. +7 (903) 902-26-24, эл. почта: io197724@gmail.com).

микроокружением, в сумме с гипоксией и неоангиогенезом это создает собственную высоко-протуморогенную среду опухоли. В конечном итоге становится трудно контролировать опухоль, используя только сбалансированное современное лечение, состоящее из максимальной резекции, лучевой терапии и химиотерапии темозоламидом [1–3].

В настоящее время для лечения глиом перспективен метод бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ), при которой препараты, содержащие ^{10}B , накапливаются в опухолевых клетках с последующим их облучением пучком эпитеческих нейтронов. Вследствие этого происходит уничтожение раковых клеток, отчасти избыtkом выделившейся при ядерной реакции энергии, отчасти формированием активных форм кислорода. Этот метод имеет преимущество перед традиционными химио- и лучевой терапией, т.к. он позволяет более избирательно уничтожать опухолевые клетки, не оказывая существенного влияния на здоровые ткани. Но и он зачастую оказывается недостаточно эффективным. Текущие противораковые исследования показывают, что сочетание нескольких методов лечения может значительно улучшить уничтожение опухолевых клеток. Предполагается, что сочетание химиотерапии с БНЗТ может обеспечить высокую эффективность терапии и крайне актуально на сегодняшний день [4–7].

В нашей работе мы совместили в составе одной терапевтической конструкции кластеры бора и химиотерапевтическую молекулу – гемцитабин ($2',2'$ -дифтордезоксицитидин), который достаточно эффективен против многих видов рака, а также считается золотым стандартом и первым одобренным FDA препаратом, используемым в качестве монотерапии при лечении рака поджелудочной железы.

Имеется достаточное количество исследований, в которых терапевтический конъюгат содержит как гемцитабин, так и атомы бора, однако итоговая конструкция не рассматривается в рамках БНЗТ [8–10]. В частности, бортезомиб – ингибитор протеасом первого поколения – широко применяется в сочетании с гемцитабином [11].

Из-за плохой фармакокинетики гемцитабина необходима усовершенствованная система его доставки в пораженные клетки [12, 13]. Поскольку существует необходимость совмещения

химиотерапевтической молекулы и борного кластера в составе одной конструкции, необходимо, чтобы система доставки позволяла осуществить присоединение нескольких функциональных групп. Таким носителем может быть сывороточный альбумин человека (HSA), хорошо зарекомендовавший себя в качестве платформы для различных диагностических и терапевтических применений [14–17]. HSA успешно использовался клинически в качестве нековалентного носителя инсулина (например, левемир), GLP-1 (например, лираглютид) и паклитаксела (например, абраксан) [18].

В большинстве исследований, посвященных созданию терапевтических конструкций, в том числе наночастиц, с использованием гемцитабина и HSA используются нековалентные комплексы [6, 7, 19–21]. Также имеется небольшое количество исследований, в которых был задействован ковалентный конъюгат HSA и гемцитабина [22–24].

Нековалентное взаимодействие альбумина с кластерами бора рассматривалось как способ усиления их растворимости и биодоступности при биомедицинских применениях. Оказалось, что альбумин – один из лучших биополимеров, которые можно использовать для указанной цели [25, 26]. Также в работе [27] было очень подробно исследовано нековалентное взаимодействие соединений, содержащих кластеры бора с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Авторы показали, что комплексообразование между металлокомплексами бикластерами бора и BSA очень эффективно, имеет гидрофобный характер и вносит небольшие изменения в пространственную укладку молекулы белка. При этом включение бискарбоната кобальта в структуру биоактивной молекулы может существенно повлиять на ее взаимодействие с сывороточным альбумином, а ковалентное присоединение органического компонента к металлокарборанам не приводит к значительному снижению прочности взаимодействия с BSA, равно как и замена координированного атома металла в составе металлокарборана. Нековалентное взаимодействие клозодекабората с BSA оказалось намного слабее и не вносило никаких изменений в пространственную укладку белка. Таким образом, создание конъюгатов клозо-додекаборана и альбумина для биомедицинских целей, по-видимому, требует про-

ведения ковалентного присоединения компонентов друг к другу.

В настоящее время исследовательская группа под руководством Х. Накамуры разработала клозо-додекаборат, функционализированный малеимидом или изотиоцианатом, и использовала его для создания ковалентных аддуктов с альбумином [28–31]. Ранее в нашей рабочей группе также был предложен способ борирования HSA по остаткам лизина через взаимодействие с аналогом тиолактона гомоцистеина, несущего борный кластер, и по остаткам аргинина через взаимодействие с теноилтрифторацетоном в боратном буфере. Полученная конструкция хорошо проявила себя в экспериментах *in vitro* при облучении нейтронами [32]. В другой нашей работе была создана конструкция на основе альбумина, содержащая аналог гемцитабина и клозо-додекаборат, введенные в состав альбумина с использованием модифицированного тиолактона гомоцистеина [24]. Эта конструкция проявила значительную цитотоксичность *in vitro* в отношении клеток глиобластомы человека. Аналог тиолактона, несущий *бис*(дикарболид) кобальта, был использован для создания альбуминовых конструкций, включающих ауристатины в качестве химиотерапевтических молекул [33]. Использование аналогов тиолактона гомоцистеина при создании конструкций на основе HSA позволяет увеличивать количество необходимых для тиол-клик-химии меркаптогрупп без необходимости восстанавливать дисульфидные мо-

стки альбумина. При этом появляется возможность задействовать Cys34 белка под внедрение сигнальной группы [24, 32–39], что позволило бы визуализировать получаемую конструкцию *in vitro* и *in vivo*.

Целью настоящего исследования была разработка борсодержащей конструкции на основе HSA, функционализированной аналогом химиотерапевтической молекулы – гемцитабином и сигнальной молекулой, предназначеннной для визуализации данной конструкции в условиях биологических экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания конструкций на основе альбумина были использованы новые аналоги тиолактона гомоцистеина, содержащие производное клозо-додекабората, либо *бис*(дикарболид) кобальта. Новые меченные флуорофором бор-гомоцистамидные конъюгаты сывороточного альбумина человека были использованы в тиол-клик-химии для получения многофункциональных конструкций с двумя типами малеимидных аналогов гемцитабина, один из которых содержал клозо-додекаборат, присоединенный к азотистому основанию.

Борсодержащий аналог тиолактона гомоцистеина (HTL-B₁₂), несущий клозо-додекаборат, был синтезирован путем алкилирования аминогруппы тиолактона гомоцистеина (**I**) диоксановым производным клозо-додекабората (**II**) (рис. 1). Синтез производного тиолактона гомоцистеина, содержащего *бис*(дикарболид) кобальта (HTL-

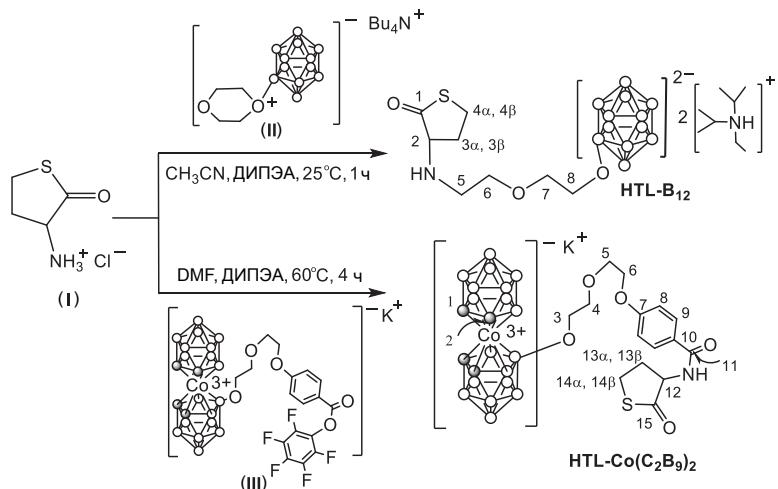


Рис. 1. Схема синтеза аналогов тиолактона гомоцистеина HTL-B₁₂ и HTL-Co(C₂B₉)₂. ДИПЭА – дипропилэтамин, ДМФ – диметилформамид.

$\text{Co}(\text{C}_2\text{B}_9)_2$, проводили путем ацилирования аминогруппы тиолактона гомоцистеина соответствующим пентафторфениловым эфиром (соединение (III), рис. 1). Разделение реакционной смеси в обоих случаях проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле, как описано в разделе “Эксперим. часть”. Характеристики полученных соединений приведены на рис. 2 и 3.

Очевидно наличие в структурах HTL-B_{12} и $\text{HTL-Co}(\text{C}_2\text{B}_9)_2$ оставшихся неизмененными тиолактоновых фрагментов, т.к. каждый протон CH_2 -групп тиолактонового кольца дает отдельный сигнал в спектре ^1H -ЯМР. Положение сигналов в ЯМР-спектрах свидетельствует о факте присоединения аминогруппы тиолактона гомоцистеина к этиленгликоловому и *пара*-гидроксибензойному фрагментам в случае HTL-B_{12} и $\text{HTL-Co}(\text{C}_2\text{B}_9)_2$ соответственно. Прочие физико-химические характеристики подтверждают структуры борсодержащих производных тиолактона гомоцистеина. Их подробные характеристики приведены в разделе “Эксперим. часть”.

Наиболее селективный путь введения модификации в альбумин – это воздействие малеимидным производным по SH-группе остатка Cys34 в составе белка. Малеимиды при взаимодействии с белками при нейтральных значениях pH имеют определенную селективность в отношении SH-групп. Главным образом это объясняется тем, что аминогруппы остатков лизина при нейтральных значениях pH переходят в протонированное состояние, и их нуклеофильные свойства сильно проигрывают нуклеофильным свойствам меркаптогрупп.

В составе HSA имеется только один свободный остаток цистеина (Cys34) и только у небольшого процента молекул (~30%, в зависимости от конкретного источника, из которого был выделен альбумин). В остальных ~70% молекул альбумина этот остаток соединен в дисульфидный мостик с такими молекулами, как цистein и глутатион, а также он может подвергаться окислению [40]. Для проведения БНЗТ необходимо достаточно большое накопление атомов бора в клетке (10^9 атомов на клетку). Таким образом, присоединение борсодержащего малеимидного реагента по Cys34 – не оптимальная стратегия для создания конъюгатов для БНЗТ. Однако этот аминокислотный остаток может быть использован для присоединения к конструкции флуоресцентной метки, необходимой

для визуализации конъюгата *in vitro* и *in vivo* [32, 34, 36, 38, 39].

Использование борсодержащего аналога тиолактона гомоцистеина обеспечивает введение в состав белка достаточного большого количества атомов бора, с одной стороны, и нескольких дополнительных меркаптогрупп, высвобождаемых при раскрытии тиолактонового кольца, с другой стороны. Полученные меркаптогруппы можно далее использовать в реакциях клик-химии для присоединения каких-либо еще группировок, обладающих необходимыми для функционирования конструкции свойствами.

Таким образом, на первой стадии (рис. 4, путь *a*) мы использовали флуоресцентную метку Cy5 для присоединения по цистеину (Cys34) альбумина. Избыток белка по отношению к красителю был двухкратный. На второй стадии (рис. 4, путь *b*) проводили ацилирование HSA-Cy5 борсодержащими производными тиолактона гомоцистеина по остаткам лизина согласно методике [39].

На третьем этапе (рис. 4, пути *c* и *d*) полученные конъюгаты HSA-Cy5-HcyCo(C_2B_9)₂ и HSA-Cy5-HcyB₁₂ были декорированы малеимидными аналогами гемцитабина, один из которых содержал остаток *клозо*-додекабората, присоединенный через линкер к азотистому основанию. Обработку малеимидами проводили в условиях двухкратного избытка малеимидных реагентов к имеющемуся количеству SH-групп, внедренных в состав HSA с помощью аналогов тиолактона гомоцистеина.

Согласно данным электронной спектроскопии (рис. 5*a* и 6*a*), у очищенного от низкомолекулярной фракции белкового конъюгата HSA-Cy5 наблюдается 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 несколько меньше количества свободных остатков Cys34 в исходном коммерчески доступном альбумине (25%). После проведения стадии гомоцистеилирования и обработки малеимидами гемцитабина длинноволновое поглощение в электронных спектрах всех продуктов, соответствующее красителю Cy5, сохраняется (рис. 5*a* и 6*a*). В электронном спектре поглощения конъюгатов, имеющих остаток HcyCo(C_2B_9)₂, наблюдается появление полосы при длине волны 313 нм (рис. 5*a*).

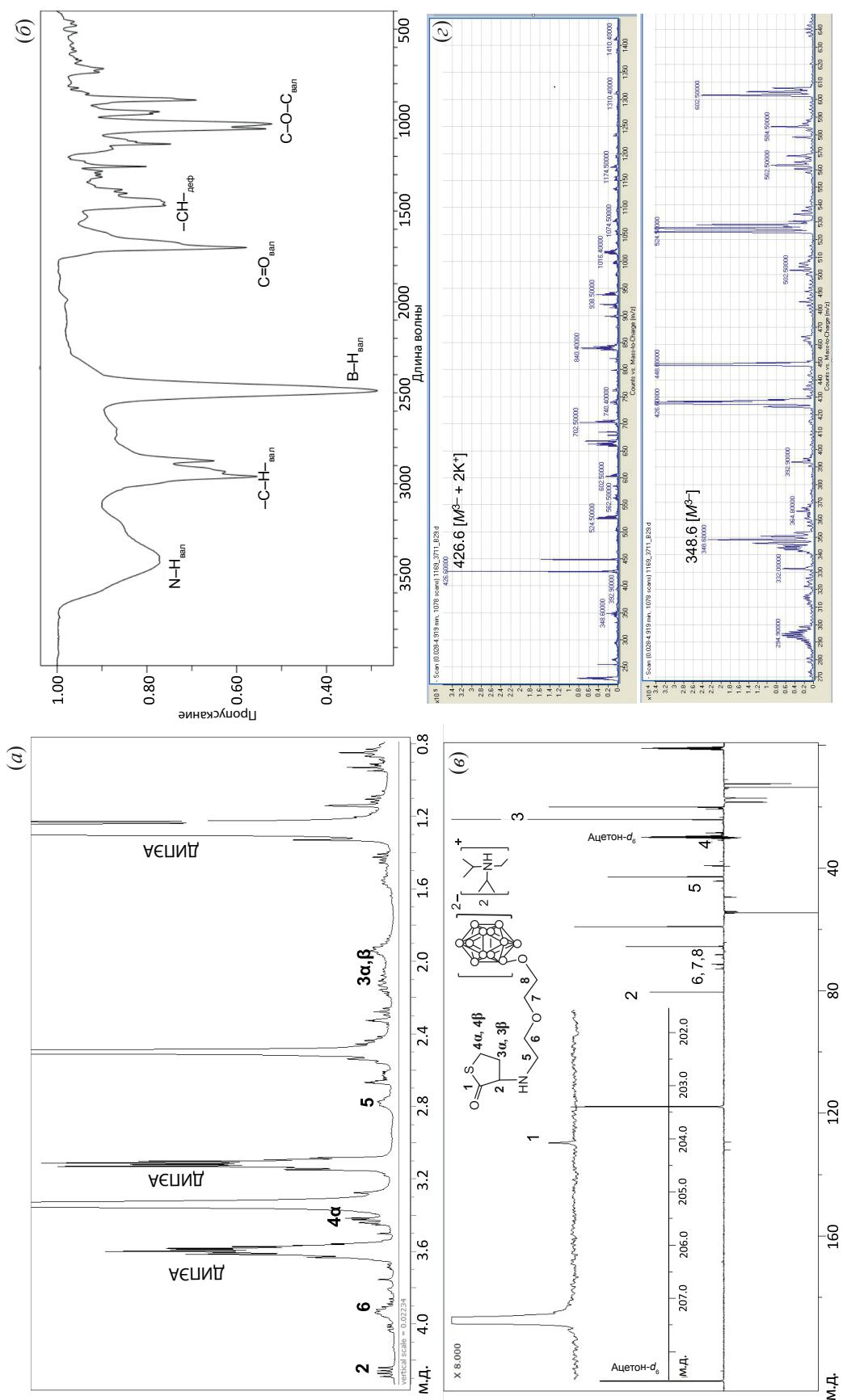


Рис. 2. Характеристики аналога тиолактона гомоцистеина HTL-B₁₂: (а) – ^1H -ЯМР в $\text{DMSO}-d_6$, дигПЭА – дигизопропилэттиламин; (б) – ИК-спектр в KBr ; (в) – ^{13}C -ЯМР в дейтерированном ацетоне; (г) – масс-спектр (электроотрицательность) в CH_3CN .

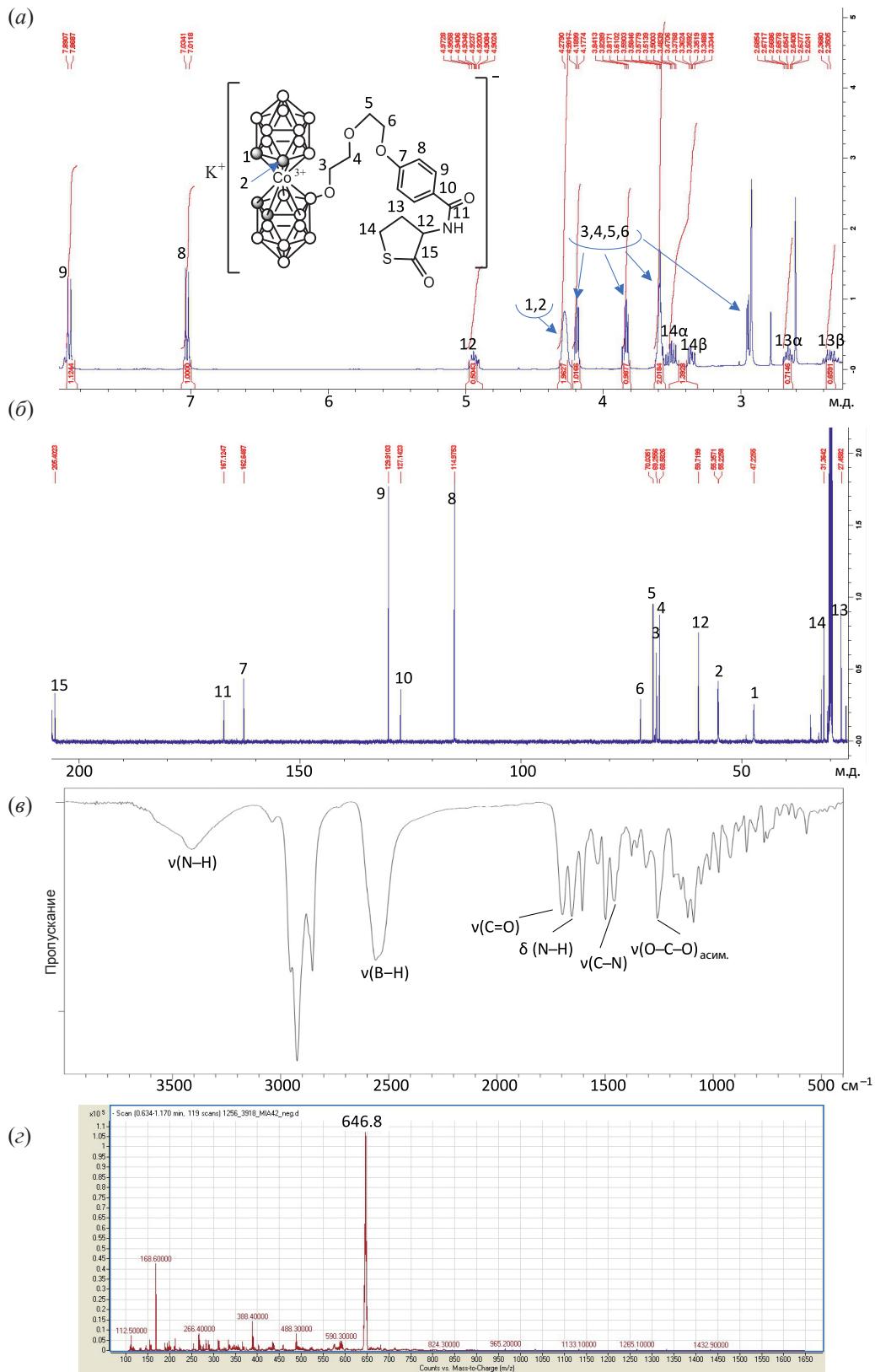


Рис. 3. Характеристики аналога тиолактона гомоцистеина HTL-Co(C₂B₉)₂: (а) – ¹H-ЯМР вдейтерированном ацетоне; (б) – ¹³C-ЯМР вдейтерированном ацетоне; (в) – ИК-спектр в КBr; (г) – масс-спектр (электроспрей) в CH₃CN.

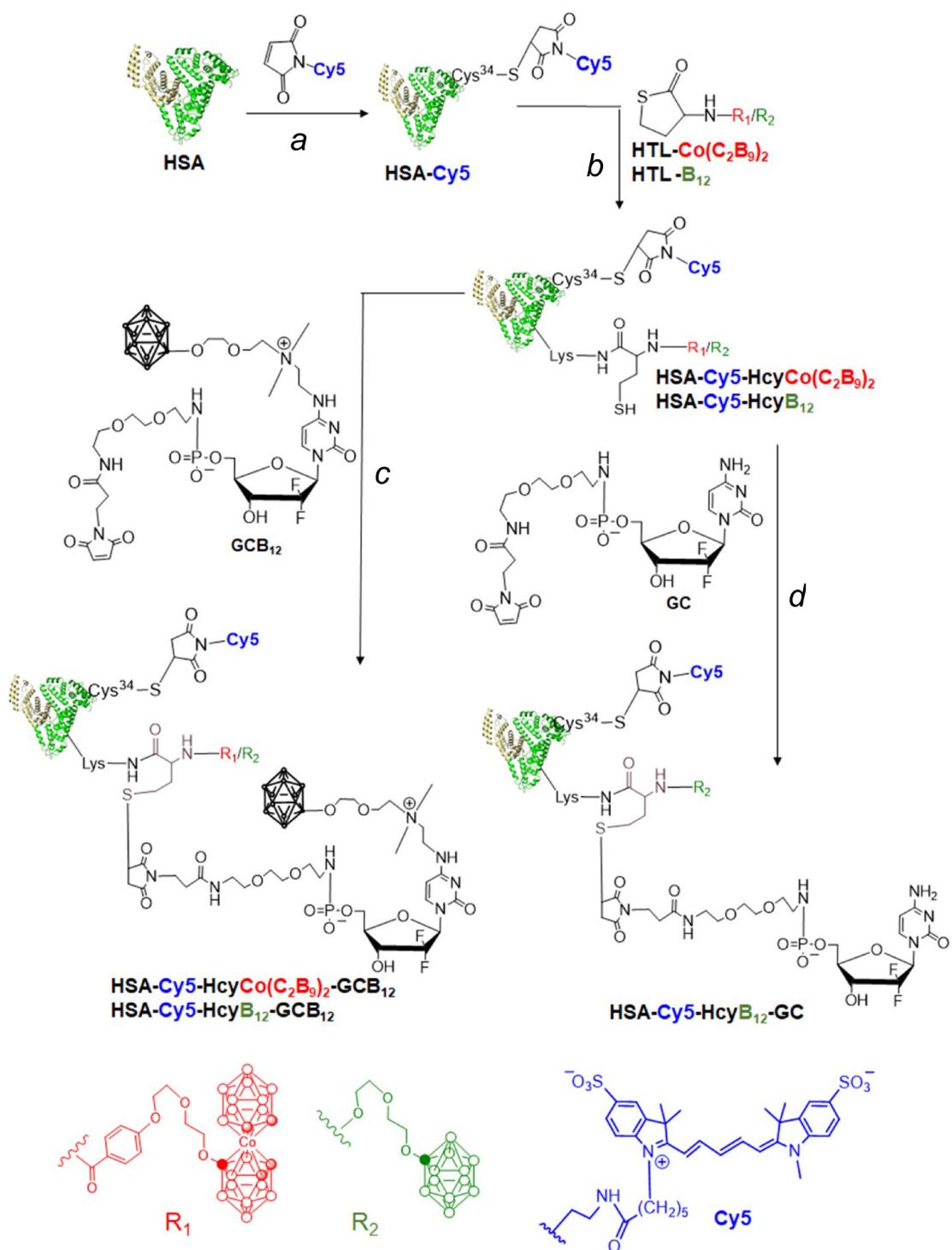


Рис. 4. Схема синтеза конъюгатов сывороточного альбумина человека, содержащих сигнальную метку, борные кластеры и аналоги гемцитабина.

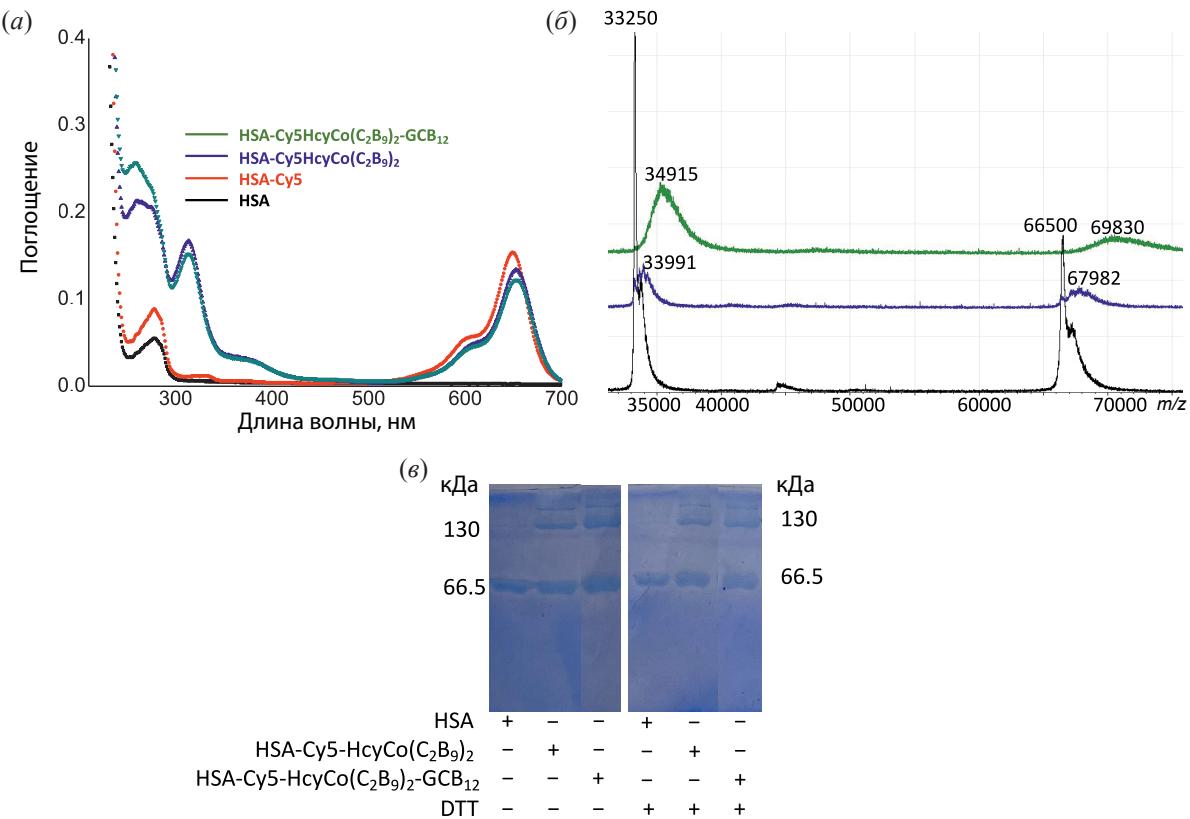


Рис. 5. Характеристики многофункциональных конъюгатов сывороточного альбумина человека: (а) – электронные спектры поглощения HSA и его гомоцистамидов в буфере PBS, pH 7.4; (б) – MALDI-TOF-спектры; (в) – SDS-PAGE гомоцистамидных конъюгатов HSA в условиях Леммли с последующим окрашиванием Кумасси синим.

В области длин волн 250–280 нм происходит небольшой сдвиг максимума поглощения в коротковолновую область из-за вклада в поглощение *bis*(дикарболида) кобальта и остатков гемцитабина.

Следует отметить, что случае любой попытки ковалентно модифицировать альбумин невозможно получить однородный в плане модификации продукт. Это происходит в силу того, что и сам коммерчески доступный образец HSA, выделяемый из крови человека, представляет собой пул одинаковых по первичной структуре, но содержащих разные природные модификации молекул. Поэтому степень модификации альбумина, которую мы используем в расчетах по результатам MALDI-TOF, усредненная.

Согласно данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии, разность средних масс HSA и HSA-Cy5 соответствует менее чем 100%-ной модификации белка (данные не приведены). Разница средних масс HSA-Cy5 и гомоцистеинамидов HSA

(рис. 5б и 6б) во всех случаях составляет величину, свидетельствующую о присоединении двух молекул аналога тиолактона к белку. Обработка полученных гомоцистамидов малеимидными аналогами гемцитабина в условиях специфичности малеимидного остатка к меркаптогруппам (нейтральное значение pH и двухкратный избыток малеимида по отношению к SH-группам) дает различный результат, в зависимости от того, содержит ли гемцитабин клозо-додекаборат, присоединенный к азотистому основанию. Разница масс гомоцистамидов и конъюгатов HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ и HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ соответствовала присоединению 2 и 2.3 остатков гемцитабина на молекулу белка, а в случае конъюгата HSA-Cy5-HcyB₁₂-GC произошло присоединение в среднем 1.5 остатков гемцитабина на молекулу белка.

Исследование содержания бора методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой дало информацию о степени модифика-

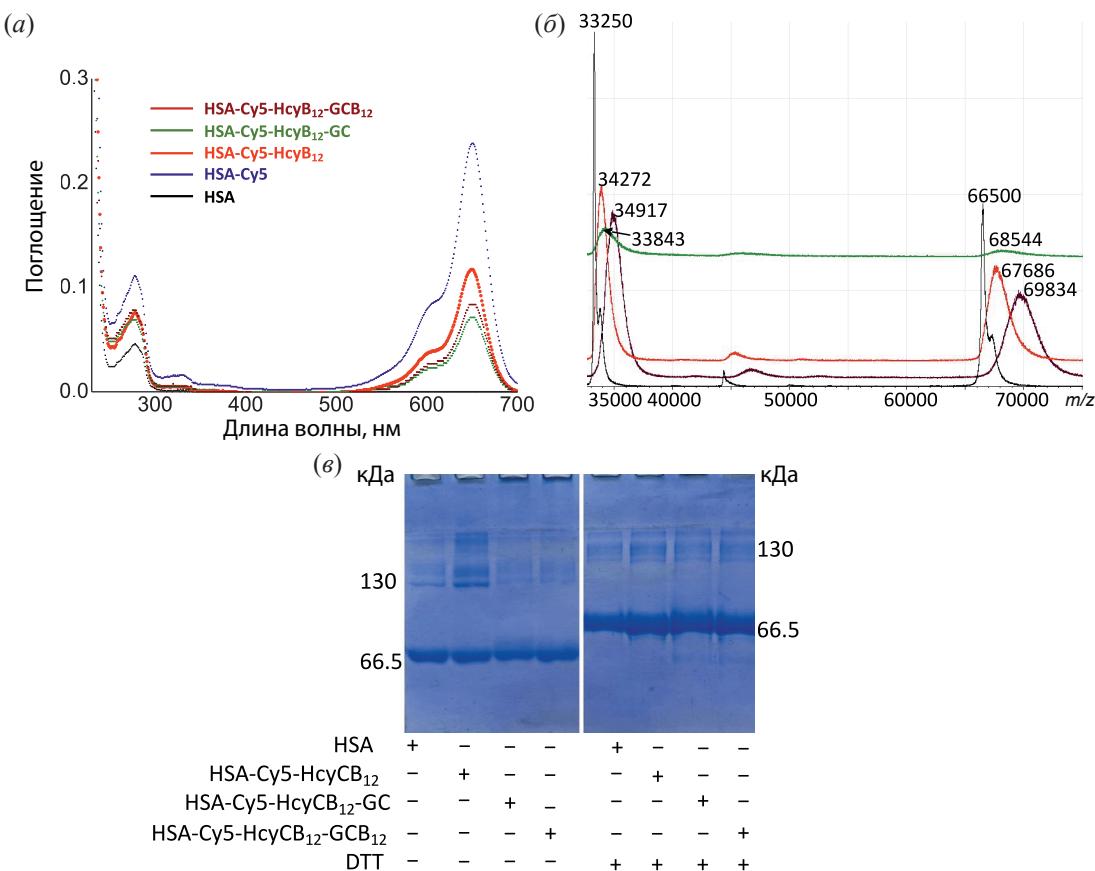


Рис. 6. Характеристики многофункциональных конъюгатов сывороточного альбумина человека: (а) – электронные спектры поглощения HSA и его гомоцистамидов в буфере PBS, pH 7.4; (б) – MALDI-TOF-спектры; (в) – SDS-PAGE гомоцистамидных конъюгатов HSA в условиях Лэммли с последующим окрашиванием Кумасси синим.

ции продуктов реакций, согласующуюся с данными MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Согласно данным электрофорограммы, представленной на рис. 5в и 6в, при гомоцистеилировании альбумина накапливаются его олигомерные формы, процент которых при проведении электрофореза в присутствии дитиотреита становится меньше. Это может свидетельствовать о том, что в образовании олигомерных форм задействовано образование S-S-мостиков между мономерами.

Для оценки ингибирования клеточной пролиферации линий глиомы человека *in vitro* конъюгатами HSA использовали данные МТТ-теста. Стволовые клетки глиомы и другие клетки, существующие в микроокружении глиомы, играют решающую роль в обеспечении иммунного ухода глиомы, инвазии опухоли и рецидива [41]. Клеточную линию T98G подвергали воздействию увеличивающихся концентраций конъюгатов на основе альбумина, что приводило к дозо-

зависимому ингибированию пролиферации после 72 ч обработки (рис. 7).

Цитотоксичность без облучения эпителевыми нейтронами гомоцистамидов, не декорированных химиотерапевтическими аналогами гемцитабина, практически отсутствовала при любом типе борсодержащих производных гомоцистеина, встроенных в структуру конструкции.

В экспериментах по измерению цитотоксичности конъюгатов в отношении клеток глиомы концентрации конъюгатов находились в диапазоне 0.02–60 мкМ, согласно содержанию в них белка. Если учесть разную степень модификации конъюгатов химиотерапевтической молекулой (1.5, 2.3 и 2.0 в случае конъюгатов HSA-Cy5-HcyB₁₂-GC, HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ и HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ соответственно), при нормировке по содержанию химиотерапевтической части следует сравнивать токсичность 60 мкМ по содержанию белка конъюгата HSA-Cy5-HcyB₁₂-

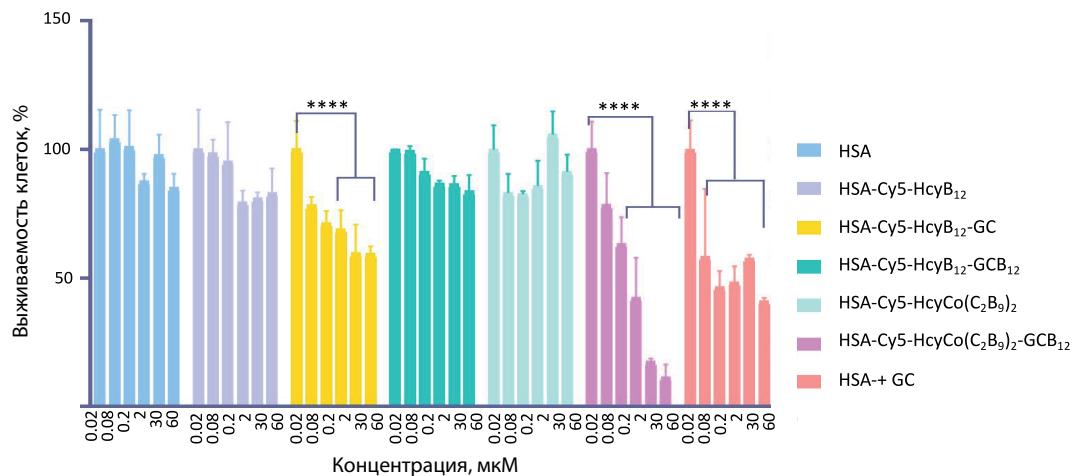


Рис. 7. Жизнеспособность клеток T98G, обработанных HSA, конъюгатами и смесью HSA + GC в течение 72 ч. Доза конъюгатов составляла 0.02–60 мкМ в белковом эквиваленте. Все данные представлены как среднее значение \pm SD ($n = 3$). Для сравнения более чем двух наборов данных использовался двусторонний дисперсионный анализ. **** $p \leq 0.0001$.

GC с 39 мкМ концентрацией HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ и с 45 мкМ концентрацией HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂. В любом случае концентрации находятся в диапазоне 30–60 мкМ для сравниваемых образцов, представленных на рис. 7. Из гистограммы видно, что цитотоксичность каждого образца в этом диапазоне мало меняется и составляет ~70% выживаемости клеток T98G для конъюгата HSA-Cy5-HcyB₁₂-GC, 90% для конъюгата HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ и ~25% для HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂.

Таким образом, можно сделать следующие выводы. Конъюгат HSA-Cy5-HcyB₁₂-GC, содержащий клозо-додекаборатный аналог гомоцистеина и не модифицированный клозододекаборатом гемцитабин, показал умеренное ингибирование роста клеток T98G, и его цитотоксичность была гораздо меньше, чем таковая для смеси альбумина с гемцитабином (HSA + GC). Аналогичная конструкция, декорированная борсодержащим гемцитабином, оказалась практически не цитотоксичной в отношении этой линии клеток глиомы. Однако конструкция HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂, также содержащая и борсодержащий гемцитабин, но оснащенная аналогом гомоцистеина, несущим бис(дикарболид) кобальта, показала значительную цитотоксичность на этой же линии клеток, и ее эффективность была даже больше, чем таковая для контроля HSA + GC.

При исследовании проникновения конъюгатов HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ (не показал цитотоксичности) и HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ (оказался цитотоксичен) в клетки T98G оказалось, что конъюгат, содержащий *bis*(дикарболид) кобальта, сильнее флуоресцирует в ядрах клеток по сравнению с тем, который содержит *clozo*-додекаборат, хотя оба конъюгата хорошо накапливаются в цитоплазме клеток (рис. 8). Как известно, трифосфат гемцитабина ингибит синтез ДНК, а его дифосфатная форма ингибит рибонуклеотидредуктазу. Поэтому для того, чтобы аналог гемцитабина подействовал, ему необходимо попасть в ядро клетки.

Таким образом, отсутствие цитотоксичности в случае конъюгата HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ на линии клеток T98G можно было бы объяснить тем, что он слабо проникает в ядро клеток.

Стоит упомянуть о том, что в случае альбуминовых конструкций, содержащих химиотерапевтический агент, результаты экспериментов *in vitro* и *in vivo* не всегда коррелируют [42]. Ковалентно связанное с альбумином химиотерапевтическое средство, показав довольно умеренную токсичность *in vitro*, может оказаться гораздо более эффективным по сравнению со свободной химиотерапевтической молекулой *in vivo*. Доставка альбумина в опухолевые ткани происходит пассивным способом из-за повышенной проницаемости и эффекта удержания, но также актив-

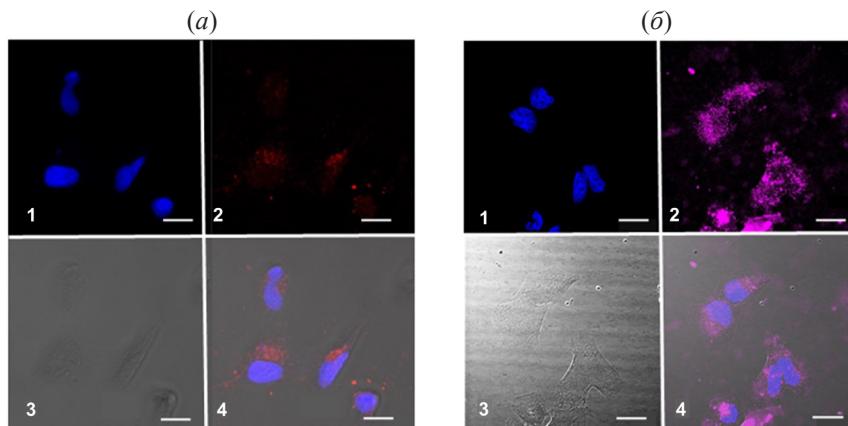


Рис. 8. Результаты конфокальной микроскопии клеток T98G, обработанных конъюгатами HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ (а) и HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ (б). Красный цвет на слайдах 2 и 4 – флуоресценция конъюгатов HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ и HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂, синий цвет на слайдах 1 и 4 – флуоресценция DAPI. Масштабные отрезки – 20 мкм. Слайд 3 – изображение живой клетки, 1 – флуоресценция DAPI, 2 – флуоресценция конъюгата, 4 – объединенные слайды 2 и 3.

ным из-за секретируемого белка SPARC и рецепторов gp60 [43]. Известно, что эти рецепторы сверхэкспрессируются в клетках глиомы высокой степени злокачественности, и при обработке альбуминсодержащими соединениями с использованием SPARC, являющегося мишенью активного транспорта [44, 45]. Альбумин может воздействовать на сверхэкспрессированные рецепторы gp-60 и SPARC, обеспечивая усиление захвата лекарств и обход механизмов их оттока. Более того, было обнаружено, что увеличение уровня экспрессии кавеолина-1 приводит к более эффективному поглощению альбумина [46]. Молекулы HSA проникают через кавеолы с Fc-рецептором, движутся вдоль актина и достигают ранней эндосомы, где часть из них сортируется для лизосомальной деградации, а другие

непосредственно транспортируются за пределы клетки путем экзоцитоза. Факт остается фактом: если принять во внимание биологию раковых клеток, то роль белков, связывающих альбумин, и кавеолина-1, по-видимому, сильно зависит от типа раковых клеток.

Руководствуясь этой гипотезой, мы провели сравнение цитотоксичности двух конъюгатов, содержащих одинаковый борсодержащий аналог гемцитабина, но разные гомоцистеиновые фрагменты, на другой линии клеток глиобластомы человека (U87).

Как видно из рис. 9, конструкция, содержащая бис(дикарболид) кобальта, вновь оказывается более цитотоксичной, чем та, что содержит гомоцистеиновый фрагмент, оснащенный клозодекабораном. Однако в этом случае ни одна

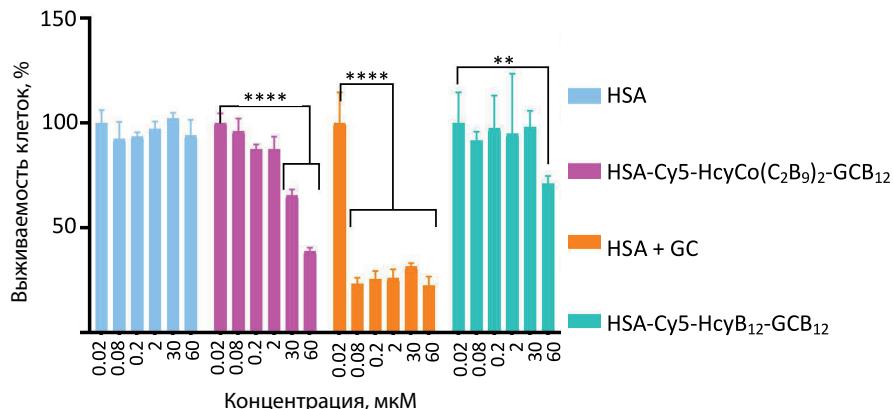


Рис. 9. Жизнеспособность клеток U87, обработанных HSA, HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂, смесью HSA + GC и HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ в течение 72 ч. Доза конъюгатов составляла 0.02–60 мкМ в белковом эквиваленте. Все данные представлены как среднее значение \pm SD ($n = 3$). Для сравнения более чем двух наборов данных использовали двусторонний дисперсионный анализ. ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$.

из конструкций не демонстрирует такой сильной цитотоксичности, как контроль (HSA + GC).

Мы ожидаем, что эти две конструкции значительно увеличат цитотоксичность *in vitro* при облучении эпителевыми нейтронами, поскольку они содержат большее количество атомов бора, чем ранее сконструированный нами конъюгат [24], который в подобном эксперименте показал такую же эффективность при облучении эпителевыми нейтронами, как обогащенный изотопом ^{10}B борфенилаланин. В перспективе также будут проведены эксперименты *in vivo*.

Таким образом, в рамках данной работы с использованием тиолактона гомоцистеина методом клик-химии были созданы конструкции на основе альбумина, содержащие два типа борных кластеров и аналоги химиотерапевтической молекулы – гемцитабина. Эти конструкции имеют увеличенное количества атомов бора, что может дать возможность уменьшения дозировки препаратов при их использовании. Кроме этого, наличие флуоресцентной группы позволит точнее рассчитывать дозу облучения нейтронами в рамках БНЗТ. Совмещение в составе одной конструкции химиотерапевтического остатка и борсодержащей группы дает возможность для проведения более эффективной терапии глиом. На данный момент эти конструкции показали эффективность химиотерапевтической нагрузки *in vitro* в отношении двух линий глиобластомы человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и клеточные линии. Клеточные линии глиобластомы человека T98G и U87 были приобретены в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Все исходные материалы и растворители самого высокого качества были получены от коммерческих поставщиков и использовались без дополнительной очистки, если не указано иное.

Пентафторфениловый эфир производного бис(дикарболида) кобальта был предоставлен И.А. Москалевым (Новосибирский государственный университет).

Борсодержащее производное гемцитабина GCB₁₂ любезно предоставлено В.И. Рогалевой и Т.В. Абрамовой (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Гидрохлорид тиолактона D,L-гомоцистеина (DL-HTL × HCl) и сывороточный альбумин человека (HSA, A3782, Sigma-Aldrich, США). Концентрации растворов альбумина определяли спектрофотометрически при $\lambda = 278$ нм, pH 7.4, используя молярный коэффициент экстинкции $3.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [47]. Малемидные аналоги гемцитабина были предоставлены В.И. Рогалевой и Т.В. Абрамовой (ИХБФМ СО РАН).

Во всех экспериментах использовали воду Milli-Q с проводимостью $>18 \text{ M}\Omega\text{/cm}$.

Физико-химические методы. Тонкослойная хроматография. Все реакции контролировали методом TCX на пластинах DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) с флуоресценцией F-254 и визуализировали в УФ-свете.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Спектры ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометрах AV-300 и AV-400 (Bruker, Германия) при 25°C в 5-мм пробирках для ЯМР. В качестве внешнего стандарта для определения химических сдвигов в спектрах ^1H -ЯМР использовали D₂O (δ 3.8 м.д.), ацетон-*d*₆ (δ 2,05 м.д.). В спектрах ^{13}C -ЯМР в качестве внешнего эталона для определения химических сдвигов использовали ацетон-*d*₆ (δ 206.35 м.д.). Химические сдвиги (δ) выражали в частях на миллион (м.д.).

ESI-масс-спектры регистрировали на ионной ловушке ESI MSD XCT (Agilent Technologies, США) в отрицательной моде в Объединенном центре геномных, протеомных и метаболомных исследований (ИХБФМ СО РАН, Россия).

MALDI-TOF-масс-спектры белков регистрировали на масс-спектрометре Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия) в положительном линейном режиме. Применили лазер Smartbeam-II. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксиацитофенон (2,5-DHAP). Образцы белка обессоливали с помощью наконечников ZipTip C4 (Millipore Ltd, Ирландия). Далее 2 мкл раствора образца белка смешивали с 2 мкл 2%-ной TFA (трифтормукусной кислоты). К полученному раствору добавляли 2 мкл матрицы (2,5-DHAP). Масс-спектры получали путем усреднения 3000 лазерных импульсов. Внешнюю калибровку осуществляли с помощью $[M + H]^+$ HSA при m/z 66.5 кДа.

Электрофоретический анализ. Конъюгаты сывороточного альбумина человека анализировали электрофорезом в ПААГ с додецилсульфатом натрия с использованием 7%-ного ПААГ в условиях Лэммли [48] без добавления ДТТ или с добавлением ДТТ в пробы, с последующим проявлением гелей Кумасси бриллиантовым синим (Bio-Rad, США).

ИК-спектр аналога тиолактона гомоцистеина HTL-Co(C₂B₉)₂ регистрировали на спектрометре Genesys 64 v/vis (ThermoFisher, США) в диапазоне 4000–400 см⁻¹ в сухом KBr.

ИК-спектр аналога тиолактона гомоцистеина HTL-B₁₂ регистрировали на Фурье-ИК-спектрометре 640-IR (Varian, США) в диапазоне 4000–400 см⁻¹ в сухом KBr.

Атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) для определения содержания бора в полученных белковых конъюгатах проводили на спектрометре высокого разрешения ICPE-9820 (Shimadzu, Япония).

Очистка белковых конъюгатов. Низкомолекулярные материалы ($M_r < 3$ кДа) удаляли из растворов полимерных конъюгатов центробежной фильтрацией с использованием концентраторов Centricon (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Ирландия).

Синтетические методики. Синтез аналога тиолактона гомоцистеина HTL-B₁₂ (рис. 1). К раствору гидрохлорида HTL (соединение (I), 61.4 мг, 0.4 ммоль) в сухом CH₃CN (1.85 мл) добавляли ДИПЭА (76.8 мкЛ, 0.44 ммоль) и раствор диоксанового производного клозо-додекабората (соединение (II), 94.5 мг, 0.2 ммоль) в сухом CH₃CN (462 мкЛ). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию контролировали с помощью TCX (элюент CH₂Cl₂). Выделение HTL-B₁₂ проводили на стеклянной колонке (длина 12 см, диаметр 1 см) с силикагелем (0.04–0.063 мм, Macheney-nagel). В качестве элюента использовали CH₂Cl₂ с градиентом концентрации CH₃OH от 0 до 100% за 1.5 ч. Фракции собирали и анализировали методом TCX в тех же условиях. Выход HTL-B₁₂ составил 29.8 мг (28.6%). TCX (CH₂Cl₂): $R_f = 0.38$. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 0.75–0.9 (м, 11H, B-H), 1.35–1.45 (м, 15H, CH₂, ДИПЭА), 1.93 (м, 3H, CH₂, м, 1H, 3β-H), 2.12 (м, 3H, CH₂, м, 1H, 3α-H), 2.77 (м, 2H, 5-H), 3.06–3.17

(м, 3H, CH₂, ДИПЭА), 3.42 (м, 1H, 4α-H), 3.53–3.66 (м, 3H, CH₂, ДИПЭА), 3.93 (м, 2H, 6-H), 4.26 (дд, 1H, 2-H, $J_{23} = 7$, 12.8). ¹³C-ЯМР (ацетон-*d*₆, CD₃CN): 24.12 (с, 1C, 3-C), 30.85 (с, 1C, 4-C), 44.15 (с, 1C, 5-C), 71.41 (с, 1C, 8-C), 72.46 (с, 1C, 6-C), 72.84 (с, 1C, 7-C), 80.48 (с, 1C, 2-C), 204.08 (с, 1C, 1-C). ИК-спектроскопия: B–H 2480 см⁻¹, C=O 1700 см⁻¹, B–O 1290 см⁻¹. МС-ЭСИ в отрицательной моде: рассчитано для [C₈O₃SNB₁₂H₂₅ + H]⁻ 348, обнаружено 348; рассчитано для [C₈O₃SNB₁₂H₂₅³⁻ + 2K⁺]⁻ 426, обнаружено 427.

Синтез аналога тиолактона гомоцистеина HTL-Co(C₂B₉)₂ (рис. 1). Раствор гидрохлорида HTL в ДМФА (соединение (I), 0.1 мл, 0.065 ммоль) смешивали с 0.015 мл ДИПЭА и добавляли к раствору пентафторфенилового эфира производного бис(дикарболлида) кобальта (III) в ДМФА (0.2 мл, 0.059 ммоль). Полученную смесь нагревали до 60°C в течение 4 ч с помощью обратного холодильника. После этого растворитель выпаривали на роторном испарителе и добавляли 0.35 мл этилацетата. Органическую фазу промывали водным раствором лимонной кислоты (10%, 2 × 0.11 мл), а затем водным раствором карбоната калия (10%, 2 × 0.12 мл). Органическую фазу сушили обезвоженным сульфатом натрия, растворитель выпаривали на ротационном испарителе. Полученное соединение очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/ацетон, 10 : 16, v/v), получая 0.026 г оранжевого масла. Выход HTL-Co(C₂B₉)₂ составил 26.5 мг (65%). ИК (KBr, см⁻¹): 3400 ν(N-H), 2990, 2910, 2840 ν(CH), 2550 ν(B-H), 1650 ν(C=O), 1620 δ(NH), 1500, 1450 ν(CN), 1230, 1120, 1090 ν(O-C-O)_{асимм}. УФ-видимая область (CH₂Cl₂): $\lambda_{max} = 246$ нм ($\varepsilon = (2.63 \pm 0.02) \times 10^5$), $\lambda_{max} = 448$ нм ($\varepsilon = (4.10 \pm 0.01) \times 10^2$). ¹H-ЯМР (ацетон-*d*₆): 2.34 (1H, м, 13β-H), 2.66 (1H, м, 13α-H), 3.35 (1H, м, 14β-H), 3.49 (1H, м, 14α-H), 4.19, 3.83, 3.58, 2.87 (8H, т, 6-H, 5-H, 4-H, 3-H), 4.28 (4H, с, 1-H, 2-H), 4.94 (1H, м, 12-H), 7.02 (2H, д, 8-H), 7.88 (2H, д, 9-H). ¹³C-ЯМР (ацетон-*d*₆): 27.5 (1C, с, C-13), 31.4 (1C, с, C-14), 47.3 (1C, с, 1-C), 55.2 (1C, с, 2-C), 59.7 (1C, с, C-12), 68.6 (1C, с, C-4), 69.3 (1C, с, C-3), 70.0 (1C, с, 5-C), 72.9 (1C, с, 6-C), 115.1 (1C, с, 8-C), 127.2 (1C, с, 10-C), 130.0 (1C, с, 9-C), 162.8 (1C, с, 7-C), 167.3 (1C, с, 11-C), 205.4 (1C, с, 15-C). МС-ЭСИ в отрицательной моде *m/z*: рассчитано для K[3,3'-Co(B₉C₂H₁₁)(8-B₉C₂H₁₁OCH₂CH₂OCH₂CH₂OC₆H₄CONH-C₄H₅SO)] 647.1; измерено 646.8.

Синтез HSA-Cy5 (рис. 4, путь a) был проведен согласно методике, описанной в работе [39].

Синтез HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ (рис. 4). Синтез HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂ был проведен согласно методике [39] (рис. 4, путь b). Раствор HSA-Cy5 в буфере PBS (2.235 мл, 8.4×10^{-4} М, 1.88 мкмоль) смешивали с HTL-Co(B₉C₂H₁₁)₂, растворенным в DMSO (118 мкл и 12.2 мкмоль). Молярное соотношение HTL-Co(B₉C₂H₁₁)₂/HSA составляло 6.5, а объемное соотношение DMSO/PBS в реакционной смеси – 0.05. Реакцию проводили в течение 42 ч при 37°C. Очистку конечного коньюгата проводили с использованием ультрафильтрационных пробирок (Amicon Centriprep YM30, Millipore, Ирландия), пропускающих молекулы с $M_r < 3000$ Да. Для промывки использовали 10% DMSO в PBS, а затем чистый PBS, все по 10 объемов реакционной смеси. Выход HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂ составил 84.3 мг (66%). Электронная спектроскопия (буфер PBS, pH 7.4): $\lambda_{max} = 268$ нм ($\epsilon = (10.45 \pm 0.1) \times 10^4$), $\lambda_{max} = 313$ нм ($\epsilon = (8.22 \pm 0.2) \times 10^4$), $\lambda_{max} = 652$ нм ($\epsilon = (6.64 \pm 0.1) \times 10^4$). Масс-спектрометрия (MALDI-TOF) m/z : измеренное среднее значение M для HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂ составляет 67 982 Да, что соответствует двум остаткам HcyCo(C₂B₉)₂ на одну молекулу HSA (измеренное среднее значение M для HSA-Cy5 66.700 Да, расчетное значение M для HcyCo(C₂B₉)₂ 647 Да). Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой: обнаружено 1.99 ± 0.08 м.д. бора при количестве коньюгата в анализируемом образце 0.036 мкмоль. Это соответствует 2.14 ± 0.09 остатков HcyCo(C₂B₉)₂ на одну молекулу белка.

Очищенный HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂ в буфере PBS (524 мкл, 0.7×10^{-3} М, 0.37 мкмоль) смешивали с аналогом гемцитабина GCB₁₂ (рис. 4, путь c), растворенным в DMSO (52.4 мкл и 2.8 мкмоль). Молярное соотношение пептид/HSA составило 7.5, а объемное соотношение DMSO/PBS в реакционной смеси – 0.1. Реакцию проводили в течение 18 ч при 37°C. Очистку итогового коньюгата проводили с помощью ультрафильтрационных пробирок Millipore, как описано выше. Выход HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂GCB₁₂ составил 20.3 мг (78.4%). Электронная спектроскопия (буфер PBS, pH 7.4): $\lambda_{max} = 258$ нм ($\epsilon = (12.25 \pm 0.1) \times 10^4$), $\lambda_{max} = 313$ нм ($\epsilon = (8.22 \pm 0.2) \times 10^4$), $\lambda_{max} = 654$ нм ($\epsilon = (6.64 \pm 0.1) \times 10^4$). Масс-спектрометрия (MALDI-TOF) m/z : измеренное среднее значение M для HSA-Cy5-

HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ составляет 69 830 Да, что соответствует двум остаткам GCB₁₂H₁₁ на одну молекулу HSA (среднее измеренное значение M для HSA-Cy5-HcyCo(C₂B₉)₂ 67.982 Да, расчетное значение M для GCB₁₂H₁₁ 924 Да). Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой: обнаружено 2.3 ± 0.09 м.д. бора при количестве коньюгата в анализируемом образце 0.024 мкмоль. Это соответствует 2.03 ± 0.02 остатков HcyCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ на одну молекулу белка.

Синтез HSA-Cy5-HcyB₁₂-GCB₁₂ и HSA-Cy5-HcyB₁₂-GC (схема 4). Синтез HSA-Cy5-HcyB₁₂ был проведен согласно адаптированной методике [39] (схема 4, путь b). HSA-Cy5 в буфере PBS (0.84 мМ, 0.931 мл, 0.78 мкмоль) смешивали с производными HTL-B₁₂ в DMSO (0.125 М, 0.05 мл, 5.04 мкмоль). Соотношение PBS и DMSO (20 : 1, v/v). Реакцию проводили в течение 42 ч при 37°C. Очистку итогового коньюгата осуществляли с помощью ультрафильтрационных пробирок Millipore, как описано выше. Выход HSA-Cy5-HcyB₁₂ составил 47.2 мг (89.5%). Электронная спектроскопия: (PBS-буфер, pH 7.4): $\lambda_{max} = 278$ нм ($\epsilon = (4.17 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), $\lambda_{max} = 650$ нм ($\epsilon = (6.5 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). MALDI-TOF, m/z : среднее измеренное значение M HSA-Cy5-HcyB₁₂ 67 686 Да, соответствует присоединению 1.98 остатков HcyB₁₂H₁₁ на молекулу белка (среднее измеренное значение M для HSA-Cy5 67.000 Да, расчетное значение M для HcyB₁₂ 347 Да). Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой: обнаружено 0.545 ± 0.02 м.д. бора при количестве коньюгата в анализируемом образце 0.014 мкмоль. Это соответствует 2.06 ± 0.08 остатков HcyB₁₂ на одну молекулу белка.

Раствор HSA-Cy5-HcyB₁₂ в буфере PBS (0.548 мл, 0.289 мМ, 0.158 мкмоль) смешивали с раствором малеимидного производного гемцитабина GC (0.311 мг, 27.4 мкл, 0.539 мкмоль) или его аналога, содержащего клозо-додекаборат GC-B₁₂ в DMSP (0.498 мг, 27.4 мкл, 0.539 мкмоль). Реакционную смесь инкубировали при постоянном перемешивании при 37°C в течение 18 ч (рис. 4, пути c и d). Очистку итогового коньюгата проводили с помощью ультрафильтрационных пробирок Millipore, как описано выше.

Выход HSA-Cy5-HcyB₁₂-GC составил 30.7 мг (83%). Электронная спектроскопия (PBS-буфер, pH 7.4): $\lambda_{max} = 278$ нм ($\epsilon = (6.4 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), $\lambda_{max} = 650$ нм ($\epsilon = (6.5 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). MALDI-TOF, m/z : среднее измеренное значение M HSA-

Су5-НсуВ₁₂-GC 68 544 Да, соответствует присоединению 1.49 остатков GC на молекулу белка (среднее измеренное значение *M* для HSA-Су5 67.686 Да, расчетное значение *M* для GC 577 Да).

Выход HSA-Су5-НсуВ₁₂-GCB₁₂ составил 26.3 мг (70%). Электронная спектроскопия (PBS-буфер, pH 7.4): $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ нм}$ ($\epsilon = (6.1 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ нм}$ ($\epsilon = (6.5 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). MALDI-TOF, *m/z*: среднее измеренное значение *M* HSA-Су5-НсуВ₁₂-GCB₁₂ 69 834 Да, соответствует присоединению 2.3 остатков GCB₁₂ на молекулу белка (среднее измеренное значение *M* для HSA-Су5 67 686 Да, расчетное значение *M* для GCB₁₂ 924 Да). Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой: обнаружено $1.78 \pm 0.07 \text{ м.д. бора}$ при количестве конъюгата в анализируемом образце 0.02 мкмоль. Это соответствует 2.3 ± 0.1 остатков GCB₁₂ на одну молекулу белка.

Анализ жизнеспособности клеток (MTT-тест). Влияние модифицированных образцов белка на клеточных линиях глиомы человека T98G и U87 (приобретены в Институте цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) проводили с помощью MTT-теста [49]. 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 и его конъюгаты (HSA, HSA-Су5-НсуCo(C₂B₉)₂, HSA-Су5-НсуCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂, HSA-Су5-НсуВ₁₂, HSA-Су5-НсуВ₁₂-GC, HSA-Су5-НсуВ₁₂-GCB₁₂, HSA + GC). Концентрации конъюгатов находились в диапазоне 0.02–60 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 было проведено три независимых теста. Полученные результаты обрабатывали с использованием пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США) и Prizm 8.0 (GraphPad Software, США). Сравнение качествен-

ных переменных производили при помощи критерия *c²*-квадрат Пирсона. Различия считали статистически значимыми при *p* < 0.05. Данные представлены как средние значения со стандартными отклонениями.

Проникновение конъюгатов HSA-Су5-НсуCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ и HSA-Су5-НсуВ₁₂-GCB₁₂ в клетки глиобластомы человека. Клетки глиобластомы человека T98G и U87 (10^5 кл./мл, 100 мкл) высевали в 96-луночные планшеты с оптическим дном с основанием для покровного стекла (Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™) в среде IMDM (MP Biomedicals, США), содержащей 10% FBS, пенициллин (100 ед./мл), стрептомицин (0.1 мг/мл) и амфотерицин (0.25 мкг/мл). После преинкубации в течение 17 ч во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, среду заменяли свежей средой, содержащей конъюгаты HSA-Су5-НсуCo(C₂B₉)₂-GCB₁₂ и HSA-Су5-НсуВ₁₂-GCB₁₂ (20 мкМ). После инкубации при 37°C в течение 3 ч клетки промывали 3 раза буфером PBS. Далее фиксировали в 4%-ном формальдегиде в PBS при комнатной температуре в течение 20 мин, после чего дважды промывали буфером PBS и окрашивали DAPI (Fluoroshield™ с DAPI, Sigma-Aldrich, США). Внутриклеточную локализацию конъюгатов альбумина оценивали с помощью сканирующей флуоресцентной микроскопии (микроскоп IX83P2ZF, Olympus, Япония, красная флуоресценция Су5 $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}} = 699 \text{ нм}$, увеличение $600\times$). Внутриклеточное распределение ядер, окрашенных DAPI, наблюдали методом сканирования, флуоресцентная микроскопия (DAPI: $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}} = 425\text{--}475 \text{ нм}$). Изображения обрабатывали в программе ImageJ (National Institutes of Health, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы с использованием разработанных нами борсодержащих аналогов тиолактона гомоцистеина были созданы конструкции на основе сывороточного альбумина человека, содержащие сигнальные флуоресцентные метки, два типа кластеров бора (клозо-додекаборат и бис(дикарболид) кобальта) и аналоги химиотерапевтической молекулы – гемцитабина. Эти конструкции имеют увеличенное количества атомов бора, что может дать возможность уменьшения дозировки препаратов при их использовании в рамках терапии раковых опухолей методом

БНЗТ. Совмещение в составе одной конструкции химиотерапевтического остатка и борсодержащей группы дает в перспективе возможность для проведения более эффективной терапии глиом. На данный момент эти конструкции показали эффективность химиотерапевтической нагрузки *in vitro* в отношении двух линий глиобластомы человека. Конструкция, содержащая гомоцистеиновый фрагмент, несущий *бис*(дикарболид) кобальта, проявила большую цитотоксичность *in vitro* в отношении клеток глиобластомы человека, чем аналогичная конструкция, содержащая гомоцистеиновый фрагмент, оснащенный *клозо*-додекабораном.

Мы ожидаем, что эти две конструкции значительно увеличат цитотоксичность *in vitro* при облучении эпителевыми нейтронами, поскольку они содержат большее количество атомов бора, чем ранее сконструированный нами конъюгат [26], который в подобном эксперименте показал такую же эффективность при облучении эпителевыми нейтронами, как обогащенный изотопом ^{10}B борфенилаланин. В перспективе также будут проведены эксперименты *in vivo* на мышах.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равнозначный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sathornsumetee S., Reardon D.A., Desjardins A., Quinn J.A., Vredenburgh J.J., Rich J.N. // Cancer. 2007. V. 110. P. 13–24.
<https://doi.org/10.1002/cncr.22741>
2. Chen R., Smith-Cohn M., Cohen A.L., Colman H. // Neurotherapeutics. 2017. V. 14. P. 284–297.
<https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>
3. Sweety A., Abhishek C., Sandhya Y., Godhanjali C., Atharva K., Ankesh K. J., Jayant S. G., Rahul P. // Int. Rev. Immunol. 2022. V. 41. P. 582–605.
<https://doi.org/10.1080/08830185.2022.2101647>
4. Lan G., Song Q., Luan Y., Cheng Y. // Int. J. Pharm. 2024. V. 650. P. 123747.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123747>
5. Lansangan C., Khoobchandani M., Jain R., Rudensky S., Perry C.C., Patil R. // Materials (Basel). 2024. V. 17. P. 1153.
<https://doi.org/10.3390/ma17051153>
6. Yu X., Zhu W., Di Y., Gu J., Guo Z., Li H., Fu D., Jin C. // Int. J. Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 6771–6785.
<https://doi.org/10.2147/ijn.s131295>
7. Guo Z., Wang F., Di Y., Yao L., Yu X., Fu D., Li J., Jin C. // Int. J. Nanomedicine. 2018. V. 13. P. 4869–4880.
<https://doi.org/10.2147/ijn.s166769>
8. Matsushita K., Okuda T., Mori S., Konno, M., Eguchi H., Asai A., Koseki J., Iwagami Y., Yamada D., Akita H., Asaoka T., Noda T., Kawamoto K., Gotoh K., Kobayashi S., Kasahara Y., Morihiro K., Satoh T., Doki Y., Mori M., Ishii H., Obika S.A. // ChemMedChem. 2019. V. 14. P. 1384–1391.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201900324>
9. Xu Y., Huang Y., Lu W., Liu S., Xiao Y., Yu J. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2019. V. 144. P. 193–206.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.019>
10. Samaniego L.C., Martinez J.H., Acebedo S.L., Spagnuolo C.C. // Bioorg. Chem. 2019. V. 90. P. 103059.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103059>
11. Evens A.M., Rosen S.T., Helenowski I., Kline J., Larsen A., Colvin J., Winter J.N., van Besien K.M., Gordon L.I., Smith S.M. // Br. J. Haematol. 2013. V. 163. P. 55–61.
<https://doi.org/10.1111/bjh.12488>
12. Pandit B., Royzen M. // Genes (Basel). 2022. V. 13. P. 466.
<https://doi.org/10.3390/genes13030466>
13. Paroha S., Verma J., Dubey R.D., Dewangan R.P., Molugulu N., Bapat R.A., Sahoo P.K., Kesharwani P. // Int. J. Pharm. 2021. V. 592. P. 120043.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120043>

14. Elzoghby A.O., Samy W.M., Elgindy S.N. // *J. Control. Release.* 2012. V. 157. P. 168–182.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>
15. Cho H., Jeon S.I., Ahn C-H., Shim M.K., Kim K. // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. P. 728.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040728>
16. Li C., Zhang D., Pan Y., Chen B. // *Polymers.* (Basel). 2023. V. 15. P. 3354.
<https://doi.org/10.3390/polym15163354>
17. Tao H.Y., Wang R.Q., Sheng W.J., Zhen Y.S. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 187. P. 24–34.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.080>
18. Yu X., Ruan M., Wang Y., Nguyen A., Xiao W., Ajena Y., Solano L.N., Liu R., Lam K.S. // *Bioconjug. Chem.* 2022. V. 33. P. 2332–2340.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00361>
19. Ma T., Jiang J.L., Qi W.X., Chen J.Y., Xu H.P. // *Drug. Des. Devel. Ther.* 2022. V. 16. P. 2395–2406.
<https://doi.org/10.2147/dddt.s366558>
20. Kong L., Du J., Gu J., Deng J., Guo Y., Tao B., Jin C., Fu D., Li J. // *Front. Surg.* 2022. V. 9. P. 890412.
<https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.890412>
21. Wang X., Liang Y., Fei S., He H., Zhang Y., Yin T., Tang X. // *AAPS PharmSciTech.* 2018. V. 19. P. 812–819.
<https://doi.org/10.1208/s12249-017-0888-9>
22. Norouzi P., Amini M., Mottaghitalab F., Mirza-zadeh Tekie F.S., Dinarvand R., Mirzaie Z.H., Atyabi F. // *Chem. Biol. Drug. Des.* 2020. V. 96. P. 745–757.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.13044>
23. Han H., Wang J., Chen T., Yin L., Jin Q., Ji J. // *J. Colloid. Interface Sci.* 2017. V. 507. P. 217–224.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.047>
24. 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.
<https://doi.org/10.3390/molecules28062672>
25. Rak J., Kaplánek R., Král V. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. P. 1045–1048.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.038>
26. Rak J., Jakubek M., Kaplánek R., Matějíček P., Král V. // *Eur. J. Med. Chem.* 2011. V. 46. P. 1140–1146.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmchem.2011.01.032>
27. Goszczyński T.M., Fink K., Kowalski K., Leśnikowski Z.J., Boratyński J. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 9800.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10314-0>
28. Kikuchi S., Kanoh D., Sato S., Sakurai Y., Suzuki M., Nakamura H. // *J. Control. Release.* 2016. V. 237. P. 160–167.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.017>
29. Ishii S., Sato S., Asami H., Hasegawa T., Kohno J., Nakamura H. // *Org. Biomol. Chem.* 2019. V. 17. P. 5496–5499.
<https://doi.org/10.1039/c9ob00584f>
30. Nakamura H., Kikuchi S., Kaway K., Ishii S., Sato S. // *Pure Appl. Chem.* 2018. V. 90. P. 745–753.
<https://doi.org/10.1515/pac-2017-1104>
31. Sato S., Ishii H., Nakamura H. // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017. V. 2017. P. 4345.
<https://doi.org/10.1002/ejic.201701118>
32. Popova T.V., Dymova M.A., Koroleva L.S., Zakharova O.D., Lisitskiy V.A., Raskolupova V.I., Sycheva T.V., Taskaev S.Yu., Silnikov V.N., Godovikova T.S. // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 6537.
<https://doi.org/10.3390/molecules26216537>
33. Wang M., Moskalev I.A., Zakharova O.D., Kasatova A.I., Silnikov V.N., Popova T.V., Godovikova T.S. // *J. Biol. Today's World.* 2024. V. 13. P. 001–007.
<https://doi.org/10.35248/2322-3308-13.1.001>
34. Lisitskiy V.A., Khan H., Popova T.V., Chubarov A.S., Zakharova O.D., Akulov A.E., Shevelev O.B., Zavjalov E.L., Kop-tyug I.V., Moshkin M.P., Silnikov V.N., Ahmad S., Godovikova T.S. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017. V. 27. P. 3925–3930.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.084>
35. Raskolupova V.I., Popova T.V., Zakharova O.D., Nikotina A.E., Abramova T.V., Silnikov V.N. // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 2679.
<https://doi.org/10.3390/molecules26092679>
36. 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. // *Biomedicines.* 2021. V. 9. P. 74.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9010074>
37. 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 Med. Chem.* 2020. V. 11. P. 1314–1325.
<https://doi.org/10.1039/c9md00516a>
38. 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>
39. 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. // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. V. 23. 6943–6954.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.043>
40. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.12.015>
41. Ma Q., Long W., Xing C., Chu J., Luo M., Wang H.Y., Liu Q., Wang R.F. // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 2924.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02924>

42. *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.* // Clin. Cancer. Res. 2023. V. 29. P. 3457–3470.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-22-2976>
43. *Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K.* // J. Control. Release. 2000. V. 65. P. 271–284.
[https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00248-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00248-5)
44. *Park C.R., Jo J.H., Song M.G., Park J.Y., Kim Y.H., Youn H., Paek S.H., Chung J.K., Jeong J.M., Lee Y.S., Kang K.W.* // Theranostics. 2019. V. 9. P. 7447–7457.
<https://doi.org/10.7150/thno.34883>
45. *Zhao P., Wang Y., Wu A., Rao Y., Huang Y.* // ChemBioChem. 2018. V. 19. P. 1796–1805.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201800201>
46. *Cui T., Corrales-Guerrero S., Castro-Aceituno V., Nair S., Maneval D.C., Monnig C., Kearney P., Ellis S., Raheja N., Raheja N., Williams T.M.* // Mol. Ther. Oncolytics. 2023. V. 18. P. 181–192.
<https://doi.org/10.1016/j.omto.2023.08.008>
47. *Peters R.A.* // Mechanism of the toxicity of the active constituent of dichapetalum cymosum and related compounds. In: Advances in Enzymology / Eds. Nord F.F. Geneva: Interscience Publishers Inc., 1957. P. 113–159.
48. *Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K.* // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 1102–1106.
49. *Mosmann T.* // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Chemotherapeutic Boron-Containing Homocysteineamides of Human Serum Albumin

M. Wang*, S. A. Tsyrempilov*, I. A. Moskalev*, O. D. Zakharova, A. I. Kasatova***,
V. N. Silnikov**, T. S. Godovikova**, and T. V. Popova*, **, #**

Phone: +7 (903) 902-26-24: e-mail: io197724@gmail.com

* Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

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

*** Institute of Nuclear Physics SB RAS, prosp. Ak. Lavrentyeva 11, Novosibirsk, 630090 Russia

Combination of boron neutron capture therapy and chemotherapy can provide good efficacy in a cancer treatment. Development of therapeutic constructs that combine these two functions, the possibility of *in vitro* and *in vivo* visualization and a convenient platform for selective delivery to the tumor is of great relevance today. In this study, we focused on human serum albumin, a well-known drug delivery platform. We developed constructs based on albumin functionalized with boron clusters, analogues of the chemotherapeutic molecule gemcitabine and signaling molecules. To create the constructs, we developed new analogues of homocysteine thiolactone containing *closo*-dodecaborate or cobalt *bis*(dicarbollide) and a gemcitabine analogue containing *closo*-dodecaborate attached to the C5 carbon atom of the nitrogenous base. We have demonstrated that addition of the gemcitabine analogue to the conjugate structure increases its cytotoxicity towards human glioblastoma cell lines. Among the final conjugates, the highest cytotoxicity is demonstrated by the structure containing cobalt *bis*(dicarbollide). The final structures accumulate well in the cytoplasm of cancer cells. The albumin conjugate containing cobalt *bis*(dicarbollide) and a boron-containing gemcitabine analogue is capable of accumulating in the nuclei of T98G cell lines. Thus, both final albumin-based constructs showed sufficient efficacy against the human glioma cell line *in vitro*. We expect that the therapeutic conjugates we have constructed will significantly increase cytotoxicity against cancer cells when irradiated with epithermal neutrons. Combining a chemotherapeutic residue and a boron-containing group in a single construct provides the potential for more effective glioma therapy.

Keywords: theranostic conjugates of borated albumin, boron-containing gemcitabine analogues, boron-containing homocysteine thiolactone analogues, boron neutron capture therapy, boron delivery systems