

На правах рукописи

Фролова Анастасия Юрьевна

**Мультифункциональные гибридные структуры
для тераностики раковых заболеваний**

Специальность – 1.4.9 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярной тераностики отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор химических наук Мартынов Владимир Иванович.

Официальные оппоненты:

Пометун Анастасия Александровна, доктор химических наук, заведующая лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Абакумов Максим Артемович, кандидат химических наук, доцент кафедры медицинских нанобиотехнологий Медико-биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук.

Защита состоится «27» ноября 2024 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Онкологическая ситуация в мире остается крайне неблагоприятной. В частности, плохая экология и увеличение стрессового воздействия приводят к возрастающему количеству случаев возникновения рака. Рак является второй по распространенности причиной смерти. Уровень заболеваемости продолжает расти, что создает огромные физические, эмоциональные и финансовые проблемы для отдельных людей, целых семей, общин и систем здравоохранения. В настоящее время востребованы высокоточные и высокоэффективные методы борьбы с раком. Проблема воздействия на раковые клетки с минимальными повреждениями здоровых является основной в терапии рака. Ранее была разработана таргетная терапия на основе антител к ряду онкомаркеров. Ввиду частой гиперэкспрессии таких онкомаркеров на поверхности раковых клеток и высокой аффинности таргетного агента для данного подхода возникает терапевтическое окно, что приводит к существенному увеличению терапевтического индекса по сравнению с традиционными методами лечения рака. Несмотря на эффективность этих препаратов, адаптивные механизмы опухоли могут привести к ее множественной лекарственной устойчивости, что часто приводит к рецидиву заболевания и низкому качеству жизни пациентов. Также для многих типов опухолей может не наблюдаться гиперэкспрессии онкомаркеров, что является существенным ограничением данного вида терапии.

Известно, что в подгруппе человеческих опухолей существует метаболическая гетерогенность: некоторые клетки преимущественно используют гликолиз, в то время как механизмом энергообеспечения других является окислительное фосфорилирование. Высокопролиферативные раковые клетки, опухолевая строма и активированные иммунные клетки в пределах опухолевого микроокружения имеют тенденцию к использованию гликолиза в ответ на высокие энергетические потребности в условиях гипоксии (эффект Пастера) или в достаточном присутствии кислорода (эффект Варбурга), значительно снижая рН во внеклеточном пространстве. Независимо от молекулярного профиля раковых клеток, способность к закислению межклеточного пространства является их общим свойством. Ввиду этого в последние годы активно развивающимся направлением в терапии рака является нацеливание на кислотное микроокружение опухоли.

Нацеливание на области тканей с пониженным рН можно осуществить при помощи пептидов семейства рНЛIP (pH low insertion peptide), которые при физиологических значениях рН растворимы в воде и имеют неупорядоченную структуру, а при подкислении способны к приобретению альфа-спиральной структуры, сопровождающейся встраиванием в клеточную мембрану. В течение последнего десятилетия был разработан ряд пептидов семейства рНЛIP, обладающих улучшенными рН-зависимыми свойствами. рНЛIP-технология уже применялась при доставке к злокачественным новообразованиям различных низкомолекулярных агентов, пептидно-нуклеиновых кислот, липосом и наночастиц, инкапсулированных терапевтическими препаратами. В настоящее время агенты на основе рНЛIP и индоцианина зеленого (ICG, NCT05130801), а также рНЛIP и экзатекана (CBX-12, NCT0490287) проходят клинические испытания на людях.

В 2015 г появилось первое сообщение о получении противоопухолевого агента, представленного конструкцией слияния белкового компонента и пептида рНЛIP. Непосредственно белки в качестве терапевтических препаратов весьма успешно используются в практике и, в настоящее время, их потенциал получил беспрецедентное признание. Получение конструкций на основе пептидов рНЛIP и белков является перспективным направлением, однако на настоящий момент в литературе представлено лишь незначительное количество работ по данной тематике.

Цель исследования и задачи

Целью настоящей работы стало изучение возможностей применения рНЛIP-технологии в виде белков слияния и оценка ее потенциала по доставке высокомолекулярной нагрузки к раковым клеткам для получения новых агентов для тераностики рака. Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

1. При помощи методов генной инженерии получить гибридные конструкции на основе вариантов пептидов рНЛIP и различных флуоресцентных белков (ФБ), в том числе, обладающих фототоксичными свойствами.
2. Разработать методики тестирования гибридных конструкций на клеточных линиях при пониженных значениях рН.
3. Изучить рН-чувствительные свойства пептидно-белковых конструкций на моделях раковых клеток, определить степень токсичности.

4. На моделях *in vivo* изучить распределение гибридной конструкции ФБ-pHLIP, демонстрирующей наиболее эффективное связывание *in vitro* при пониженных значениях pH.
5. Изучить влияние природы нескольких синтетических флуоресцентных меток на pH-селективность их конъюгатов с пептидом pHLIP или с гибридной конструкцией ФБ-pHLIP.

Научная новизна

Получение конструкций на основе пептидов pHLIP и белков является перспективным направлением в онкотерапии. Во-первых, белковые молекулы могут выполнять огромное количество функций, действуя как токсины, катализаторы, сигнальные молекулы, молекулярные и ионные переносчики, каркасы для поддержания целостности клеток и тканей, рецепторы и прочее. Во-вторых, ввиду возможности генетического кодирования последовательностей пептидов pHLIP получение таких белково-пептидных конструкций возможно без задействования этапов химического синтеза, а при помощи сочетания стандартных протоколов генной инженерии и бактериальной наработки рекомбинантных белков. Однако, несмотря на очевидную привлекательность данного направления, на момент начала настоящей работы было известно об успешном получении всего лишь двух конструкций такого рода. Параллельно с ходом текущей работы и выходом публикаций, посвященных ее результатам, в литературе появились новые публикации научных конкурентов по данной тематике, что свидетельствует о ее актуальности и своевременности. Настоящая работа отличается от других работ в данной инновационной области 1) комплексностью: были получены, изучены и проанализированы десятки конструкций на основе белков и пептидов семейства pHLIP; и 2) систематичностью: впервые были выявлены закономерности, влияющие на эффективность pH-зависимого связывания гибридных конструкций с мембранами клеток, и с учетом этого предложены новые подходы для получения высокоактивных мультидоменных структур в условиях пониженных pH.

Теоретическая и практическая значимость

В результате выполнения данной работы было установлено, что получение multifunctionальных гибридных конструкций на основе белков и пептидов pHLIP с сохранением их исходных функций является нетривиальной задачей. В результате получения конструкций на основе флуоресцентных белков и нескольких пептидов pHLIP

в разных комбинациях был обнаружен ряд моментов, негативно сказывающихся либо на белковый компонент в составе гибридных конструкций (нарушение фолдирования ФБ), либо на рН-чувствительный (низкая эффективность рН-зависимого связывания пептида рНЛIP). Установлено, что на эффективность рН-зависимого связывания таких конструкций может влиять тип линкера, используемого при соединении молекулы белка с пептидом рНЛIP. Продемонстрировано, что снижение эффективности рН-зависимого связывания у исследуемых конструкций обусловлено межмолекулярными взаимодействиями пептида рНЛIP с другими функциональными компонентами этих конструкций. На основе вышеперечисленных результатов были предложены стратегии для получения гибридных конструкций на основе белков и пептидов семейства рНЛIP, что, вероятно, поможет в дальнейшем избежать проблем, связанных с получением целевых конструкций с низкой рН-чувствительностью. Также было установлено, что некоторые варианты пептида рНЛIP не эффективны при доставке белковой высокомолекулярной нагрузки к раковым клеткам пониженных рН. Продемонстрировано влияние на рН-зависимые свойства гибридной конструкции на основе ФБ и рНЛIP дополнительной нагрузки в виде гидрофобной низкомолекулярной метки, химически конъюгированной вблизи последовательности пептида рНЛIP. Было показано, что гибридные рН-чувствительные конструкции способны к быстрому внутриклеточному проникновению за счет механизмов эндоцитоза. Данный факт стоит принимать во внимание для разработки правильной стратегии терапии препаратами вида белок-рНЛIP. Все вышеперечисленные факты, о которых сообщается впервые, могут помочь в определении оптимального дизайна конструкций при сочетании белков с пептидами семейства рНЛIP с целью получения эффективных противоопухолевых агентов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Получение мультифункциональных гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP с сохранением их первоначальных свойств является нетривиальной задачей, поскольку 1) включение последовательности пептида семейства рНЛIP в состав гибридной белковой конструкции часто влияет на фолдирование белкового компонента; 2) некоторые варианты пептида рНЛIP не эффективны при доставке белковой высокомолекулярной нагрузки к раковым клеткам при понижении рН; 3) на эффективность рН-зависимого связывания гибридных конструкций большое влияние оказывает тип линкера, используемого между молекулой белка и пептидом рНЛIP.

- Предложены подходы для получения конструкций на основе белков и пептидов семейства рНЛIP, способных к эффективному связыванию при понижении рН.
- Конъюгация гибридной конструкции на основе флуоресцентного белка и рНЛIP с гидрофобной низкомолекулярной меткой влияет на рН-зависимые свойства этой конструкции.
- Продемонстрирован потенциал применения пептидов рНЛIP в сочетании с белковыми молекулами на примерах флуоресцентных белков, обладающих, в том числе, и фототоксичными свойствами, на моделях *in vivo* и *in vitro*.

Личный вклад автора

Личный вклад Фроловой А.Ю. заключается в анализе литературных данных по теме диссертации, планировании и выполнении всей экспериментальной части работы, а также обработке и анализе полученных данных. Основные результаты исследований опубликованы в трех статьях, в которых Фролова А.Ю. является первым автором в соответствии с её ведущей ролью при выполнении диссертационной работы.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных школах и конференциях: XXVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2020, устный доклад; XXXIII зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2021, стендовый доклад; XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2021, устный доклад; XXXIV зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2022, стендовый доклад.

Структура и объём работы

Диссертационная работа изложена на 123 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 244 источника, и приложения. Работа содержит 38 рисунков и 5 таблиц.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-536).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Доставка белковых терапевтических молекул к опухоли при помощи рНЛIP является привлекательным направлением, поскольку, с одной стороны, терапевтические средства на основе белков пользуются большим успехом в клинической практике и их лечебный потенциал общепризнан, с другой стороны, конструкции данного типа являются полностью генетически кодируемыми, что облегчает их получение за счет сочетания стандартных протоколов генной инженерии и бактериальной наработки рекомбинантных белков. Однако до недавних пор данный подход был слабо реализован. К настоящему времени известно о получении шести конструкций на основе сочетания белков и рНЛIP. Все они содержали последовательность исходного пептида рНЛIPwt. Однако ранее сообщалось о получении различных мутантных вариантов рНЛIP, обладающих улучшенными рН-чувствительными свойствами в сравнении с исходным пептидом, что было продемонстрировано как на клеточных, так и на животных моделях. Таким образом, целью данной работы являлось более подробное изучение совместимости рНЛIP-технологии с высокомолекулярными белковыми компонентами для определения перспективности ее применения.

Как известно, основным фактором, определяющим активность белковой молекулы, является приобретение ею определенной вторичной и третичной структуры. В случае флуоресцентных белков (ФБ) правильное фолдирование обеспечивает автокаталитический биосинтез хромофора и в конечном итоге приобретение флуоресцентных свойств биомолекулой. В данном исследовании в качестве белковой модельной нагрузки, доставляемой при помощи пептидов рНЛIP, были выбраны именно ФБ, поскольку по эффективности синтеза хромофора можно было бы судить о степени влияния пептидов рНЛIP на первоначальные свойства ФБ.

Гибридные конструкции флуоресцентного белка EGFP с пептидами рНЛIP

На первых этапах выполнения настоящей работы были получены конструкции на основе EGFP и нескольких пептидов семейства рНЛIP: с исходным рНЛIPwt, а также с рНЛIPvar3 – вариантом, обладающим улучшенными по сравнению с рНЛIPwt показателями накопления в опухолях при доставке низкомолекулярных красителей. На N-конце конструкций находилась гексагистидиновая (6-His) последовательность и на C-конце – последовательность, соответствующая пептидам рНЛIPwt или рНЛIPvar3 (рис.

1а, б). Белковая часть в виде EGFP была связана с пептидами pHLP при помощи короткого пептидного линкера –GS–. Поскольку данные конструкции являлись полностью генетически кодируемыми, то после получения целевых генов была выполнена бактериальная наработка и выделение соответственных гибридных белков.

Для изучения pH-зависимых свойств данных конструкций на клеточных моделях была разработана оригинальная методика, использование которой не влияло на жизнеспособность клеток и обеспечивало воспроизводимость результатов. Клетки HeLa, обработанные EGFP-GS-pHLPwt и EGFP-GS-pHLPvar3 при нейтральных значениях pH, обладали низким значением флуоресцентного сигнала, сопоставимым с контрольными клетками, обработанными EGFP. Однако при $\text{pH} < 6.8$ наблюдалось многократное увеличение флуоресцентного сигнала клеток с $\text{pK}_a \sim 6.4$, при этом связывание конструкции, содержащей pHLPwt, было в несколько раз эффективнее (рис. 2а-в).

При помощи серии экспериментов с использованием специфических ингибиторов эндоцитоза на примере EGFP-GS-pHLPwt было установлено, что данная конструкция способна к интернализации внутрь клетки за счет различных типов эндоцитоза и в дальнейшем подвергается протеолитической деградации (рис. 3а, б). При помощи анализа жизнеспособности клеток HeLa было продемонстрировано, что pH-зависимое связывание EGFP-GS-pHLPwt не влияет на целостность клеточной мембраны и не вызывает каких-либо токсические эффекты (рис. 2г).

Далее были получены новые конструкции, на основе тех же функциональных частей (EGFP и пептидов pHLP), но включающие удлиненную линкерную последовательность аминокислот –IEGRCS–, которая, с одной стороны, содержит

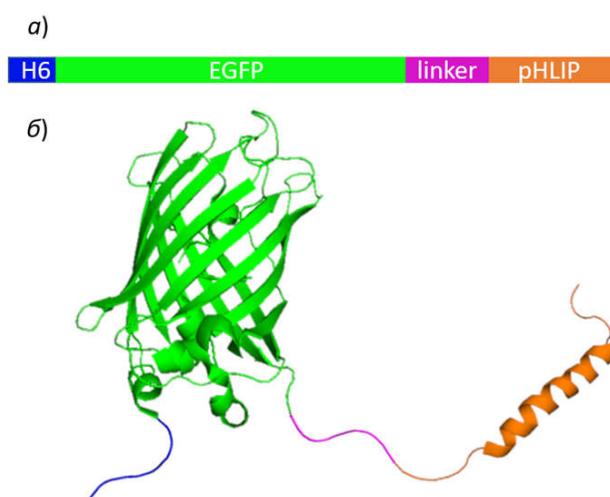
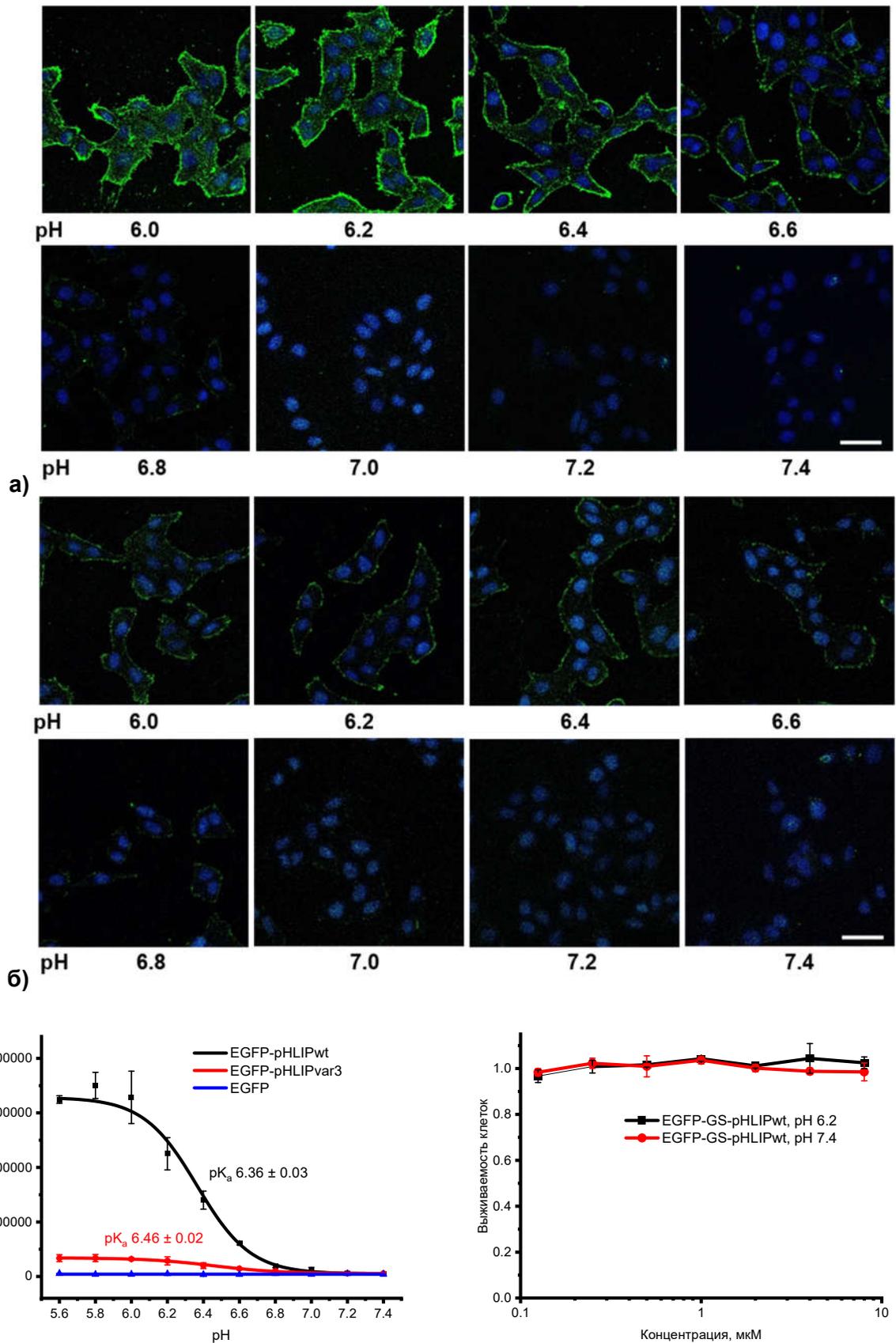


Рисунок 1. Упрощенная схема (а) и пространственная модель (б) гибридных конструкций. Гексагистидиновая последовательность обозначена синим цветом, флуоресцентный белок – зеленым, линкер (linker) – лиловым, pHLP – оранжевым.



в) г)
Рисунок 2. pH-зависимое связывание гибридных конструкций с клетками HeLa, определённое методами флуоресцентной конфокальной микроскопии (EGFP-GS-pHLIPwt (а), EGFP-GS-pHLIPvar3 (б)) и проточной цитофлуориметрии (в). Масштабный отрезок 50 мкм. Жизнеспособность клеток HeLa при различных концентрациях EGFP-GS-pHLIPwt при pH 7,4 и 6,2 (г).

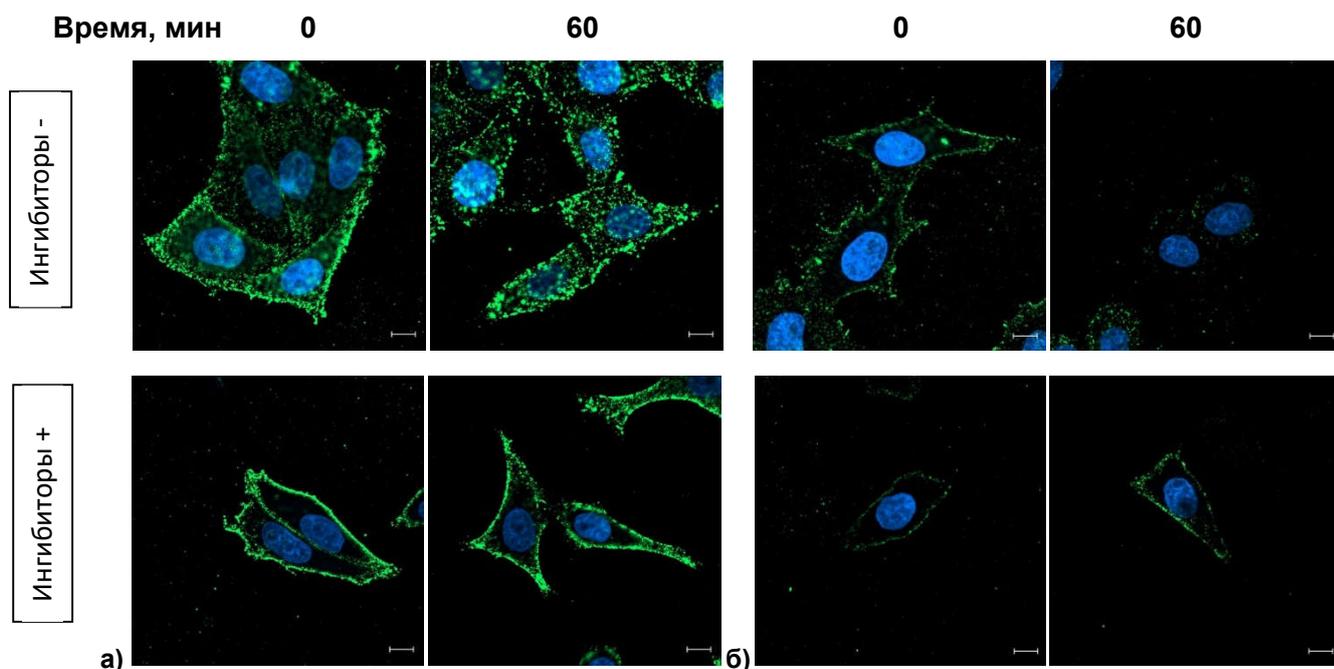


Рисунок 3. Изменение локализации сигналов флуоресценции во времени. Клетки предварительно инкубировали в растворе EGFP-GS-pHLIPwt (pH 6,2) в течение 15 (а) или 5 мин (б) с последующей инкубацией в течение 0 и 60 мин в среде DMEM в отсутствие (верхний ряд) или в присутствии ингибиторов эндоцитоза (нижний ряд). Масштабный отрезок 20 мкм.

заряженные группы, способствующие большей растворимости в водной среде, а с другой стороны, в целом обладает нейтральным зарядом.

Методом спектрофотометрии изучено влияние пептидов pHLIP на синтез хромофора EGFP в составе гибридных конструкций. В случае белково-пептидных конструкций, содержащих GS-линкер, хромофор синтезировался примерно на 20% хуже относительно контрольного EGFP, а в конструкциях с линкером IEGRCGS – примерно на 30% (табл. 1).

Клетки, обработанные EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPwt при нейтральных значениях pH, обладали низким значением флуоресцентного сигнала, однако при $\text{pH} < 6.8$ наблюдалось многократное увеличение флуоресцентного сигнала клеток с $\text{pK}_a \sim 6.4$ (рис. 4а, табл. 2), при этом связывание конструкции, содержащей линкер -IEGRCGS-, было в несколько раз эффективнее. Аналогичный результат наблюдался при сравнительном тестировании конструкций EGFP-IEGRCGS-pHLIPvar3 и EGFP-GS-pHLIPvar3. Это свидетельствует об однозначном увеличении эффективности связывания при замене GS-линкера на IEGRCGS в гибридных конструкциях (табл. 2). При использовании одного и того же типа линкера, лучшим связыванием обладали конструкции, несущие pHLIPwt (рис. 4а, б).

Таблица 1. Свойства конструкций EGFP/pHLIP и EGFP

№	Конструкция	$\epsilon_{280}, M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Степень созревания хромофора, %	Степень созревания хромофора относительно EGFP, %	Молекулярный вес, Да
1	EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt	34 380	55	71	32 122
2	EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3	32 890	55	71	31 232
3	EGFP-GS-pHLIPwt	34 380	64	83	31 564
4	EGFP-GS-pHLIPvar3	32 890	63	81	30 674
5	EGFP (контроль)	20 400	77	100	27 429

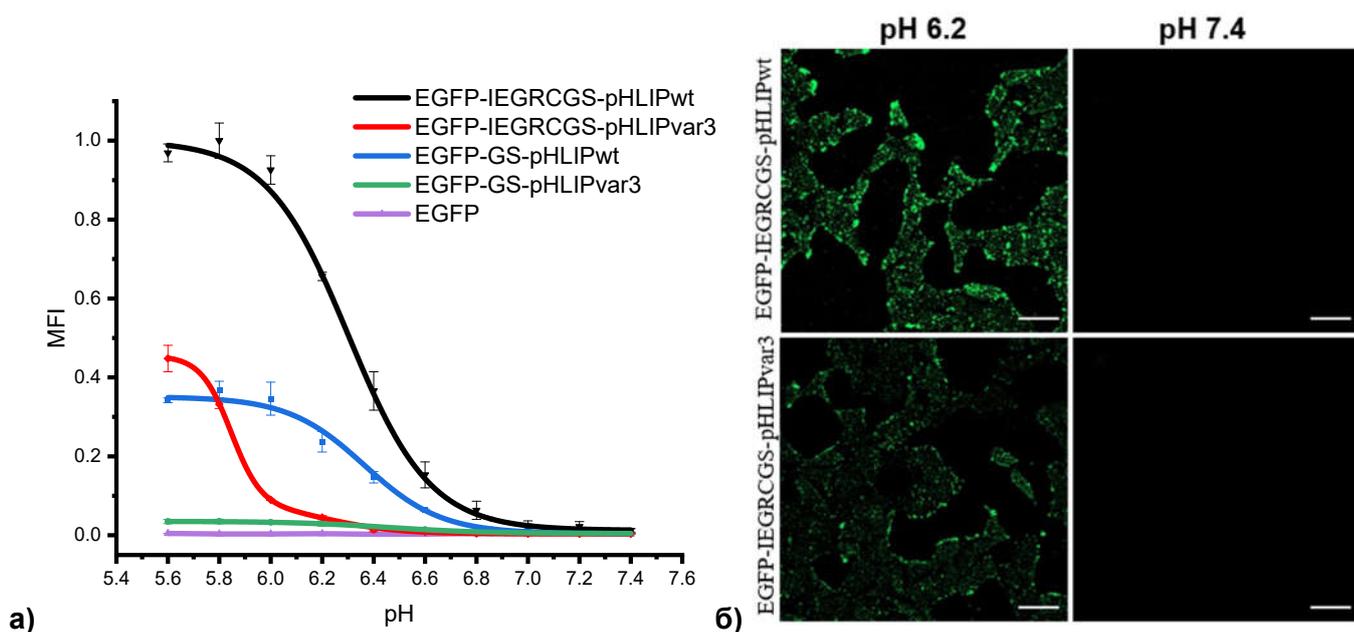


Рисунок 4. pH-зависимое связывание с клетками HeLa конструкций EGFP/pHLIP, определённое методами проточной цитофлуориметрии (а) и флуоресцентной конфокальной микроскопии (б). Значения медиан интенсивности флуоресценции (MFI) нормированы относительно EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt (наиболее эффективно связывающейся конструкции) с поправкой на степень созревания хромофора. Масштабный отрезок 20 мкм.

Таблица 2. Эффективность pH-зависимого связывания белково-пептидных конструкций с клетками HeLa

№	Конструкция	pK_a	Относительное количество белка, связавшегося с клетками*
1	EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt	6.30 ± 0.01	1
2	EGFP-GS-pHLIPwt	6.36 ± 0.03	0.35
3	EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3	$6.22 \pm 0.33,$ 5.85 ± 0.03	0.46
4	EGFP-GS-pHLIPvar3	6.46 ± 0.02	0.035

* Количество белка, связавшегося с клетками, оценивали по значению F_a – кислотной базовой линии относительно EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt.

Гибридная конструкция на основе белка miniSOG и пептида pHILIP

Чтобы оценить эффективность pHILIP при доставке белковых терапевтических агентов, в качестве еще одной белковой матрицы был выбран мутантный вариант белка miniSOG (SOPP3) – флаavin-связывающего белка, который является генетически-кодированным фотосенсибилизатором, способным к генерации синглетного кислорода в результате воздействия света.

При тестировании miniSOG-pHILIPwt (рис. 5.) на клетках HeLa наблюдалось увеличение эффективности связывания конструкции по мере понижения pH в диапазоне значений 6.0-6.8 (рис 6, 7).

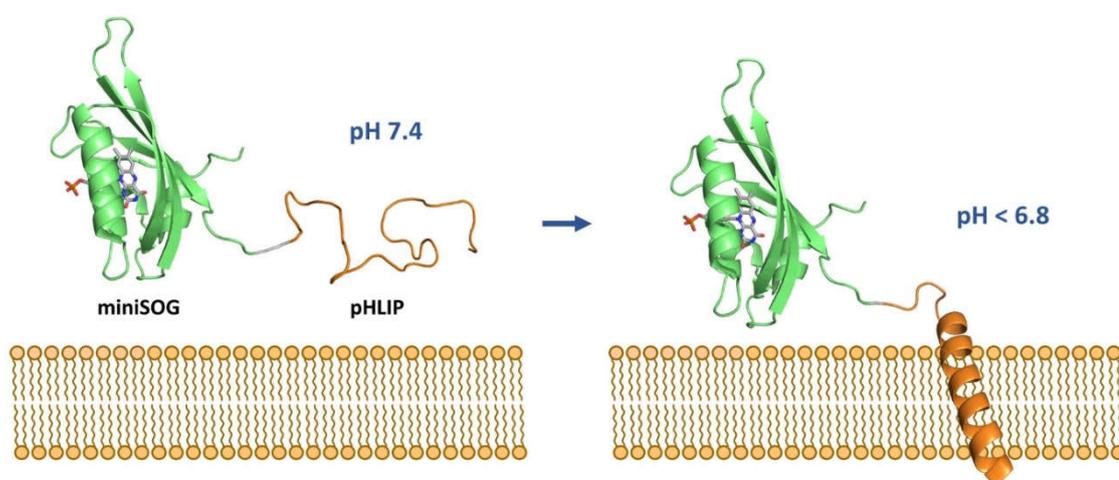


Рисунок 5. Структура гибридной конструкции miniSOG-pHILIPwt и ее pH-зависимое связывание с клеточной мембраной

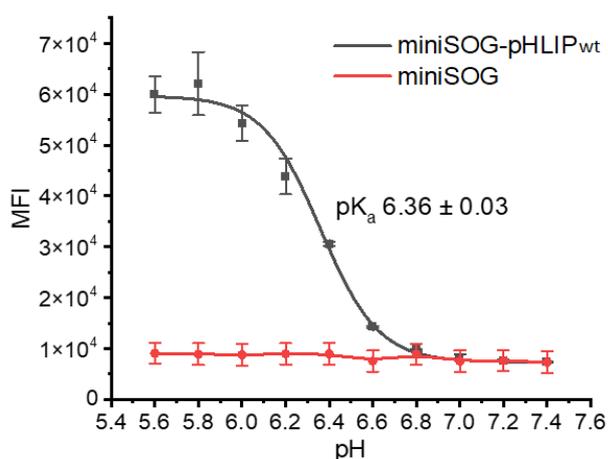


Рисунок 6. Кривые связывания miniSOG-pHILIPwt (черная) и свободного miniSOG (красная) с клетками при различных pH (при концентрации белков 1 мкМ), полученные при помощи метода проточной цитометрии.

Конструкция miniSOG-pHLIPwt проявляла фототоксичность на клетках HeLa со значением $IC_{50} \sim 3,4$ мкМ только после связывания при пониженных рН, тогда как обработка контрольным белком miniSOG не вызывала гибели клеток в тех же условиях (рис. 8а). Эффективность фототоксичного воздействия на клетки данной конструкции сопоставима с похожими конструкциями на основе фототоксичных белков и опухоль-ориентирующих пептидов. Без фотоактивации токсичности miniSOG-pHLIPwt на клетках HeLa не наблюдалось. Фотоцитотоксичность miniSOG-pHLIPwt была также подтверждена окрашиванием клеток трипановым синим в параллельных экспериментах при тех же условиях.

Была изучена рН-зависимая фототоксичность miniSOG-pHLIPwt. На основе полученных результатов было установлено, что miniSOG-pHLIPwt не проявляет фототоксичности при рН 7,4, тогда как при подкислении она значительно увеличивалась (рис. 8б). Значение рН, при котором наблюдалась гибель 50% клеток ввиду фототоксичности miniSOG-pHLIPwt, составило 6,5 и являлось достаточно близким к значению рКа процесса рН-зависимого связывания. В отличие от этого, свободный белок miniSOG не проявлял фототоксичности во всем исследуемом диапазоне значений рН. Генерация АФК конструкцией miniSOG-pHLIPwt была подтверждена с помощью сенсоров на основе красителей 1,3-дифенилизобензофурана и 6-карбокситетракарбокси-2,2',6,6'-тетракарбокси-3,3'-дифенилдиазулия в кювете и на живых клетках, соответственно.

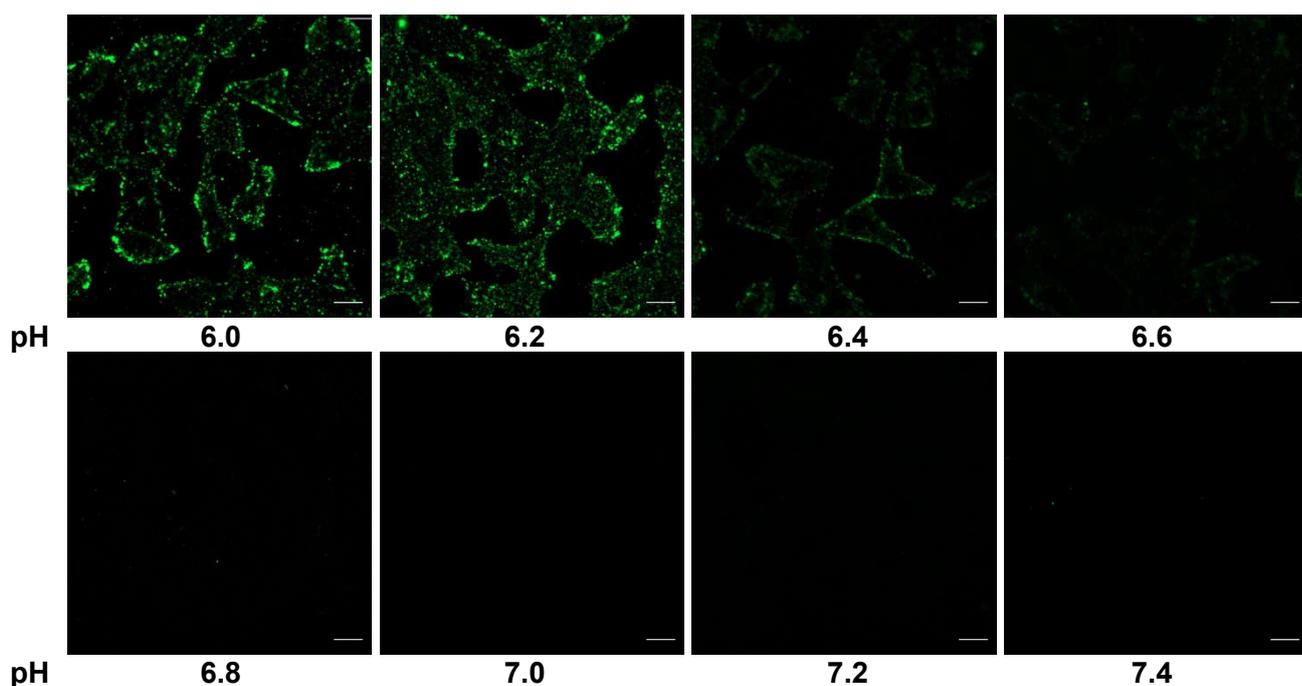


Рисунок 7. рН-зависимое связывание miniSOG-pHLIPwt с клетками HeLa, определенное с помощью конфокальной микроскопии. Масштабный отрезок 20 мкм.

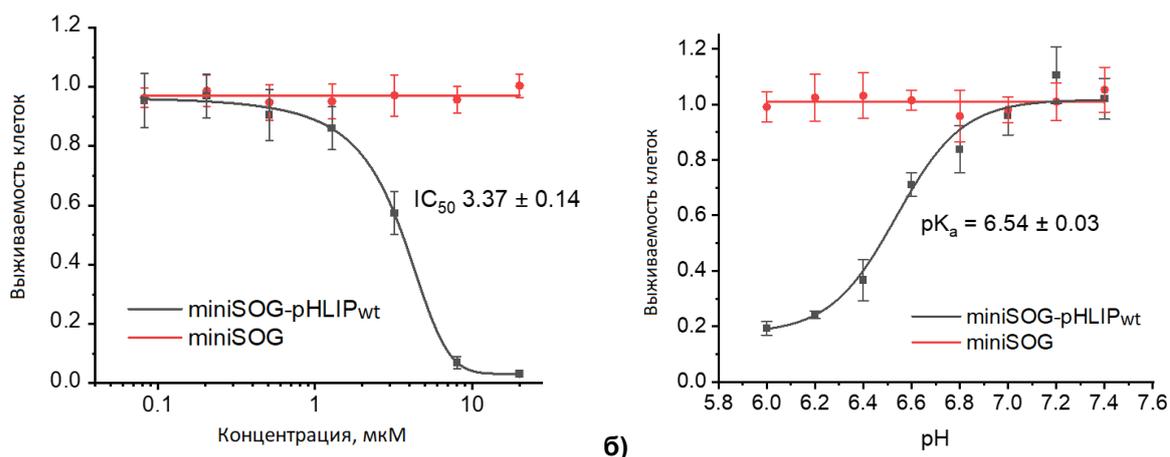


Рисунок 8. Фотоцитотоксичность miniSOG-pHLIPwt (черный) и одного miniSOG (красный) в зависимости от изменений концентрации (а) и pH (б), определенная с помощью МТТ-теста.

Влияние линкерных последовательностей на свойства конструкций mCherry/pHLIP

Был получен ряд конструкций на основе пептидов pHLIPwt и ATRAM (еще одного представителя семейства pHLIP) в сочетании с белком mCherry и несколькими линкерными последовательностями, которые, по литературным данным, использовались при получении химерных конструкций на основе флуоресцентных белков (-SGLRSRAE-, далее обозначенный как -8-) или уже были использованы в работе лаборатории ранее (-GACGIERCGS- и -GASEEGEEGIEGRCS-, далее обозначенные как -10- и -16-, соответственно).

Проведено изучение влияния этих пептидов на синтез хромофора mCherry в составе белково-пептидных конструкций. В этом случае степень созревания хромофора ФБ в составе гибридных структур была сопоставима со степенью созревания хромофора контрольного белка mCherry (табл. 4).

Таблица 4. Свойства конструкций mCherry/pHLIP и mCherry.

№	Конструкция	ϵ_{280} , M ⁻¹ cm ⁻¹	Степень созревания хромофора, %	Степень созревания хромофора относительно mCherry, %	Молекулярный вес, Да
1	mCherry-8-pHLIPwt	48 360	67	89	32 837
2	mCherry-8-ATRAM	39 880	74	98	32 170
3	mCherry-10-pHLIPwt	48 360	70	92	32 914
4	mCherry-10-ATRAM	39 880	74	98	32 248
5	mCherry-16-pHLIPwt	48 360	71	93	33 523
6	mCherry-16-ATRAM	39 880	72	95	32 862
7	mCherry (контроль)	34 380	76	100	27 990

В зависимости от структуры линкера гибридные конструкции демонстрировали разную эффективность связывания, однако наблюдались следующие закономерности: 1) при использовании одного и того же линкера более эффективно при понижении pH связывались конструкции с пептидом ATRAM (рис. 9а, б); 2) наименее и наиболее эффективное связывание при понижении pH демонстрировали конструкции, содержащие линкер -SGLRSRAE- и -GASEEGEEGIEGRCS-, соответственно (рис. 9а, б); 3) отсутствовало неспецифичное связывание у всех полученных конструкций при физиологическом значении pH (рис. 9а, б). Наиболее удачной из полученных оказалась конструкция на основе mCherry и ATRAM, объединенных линкером GASEEGEEGIEGRCS (mCherry-16-ATRAM). Ее связывание при pH 6.2 оказалось более эффективным в 20 раз по сравнению с полученной mCherry-9-ATRAM и примерно в 1,5 раза – по сравнению с аналогичной конструкцией с пептидом pHILPwt (mCherry-16-pHILPwt). Последние результаты коррелируют с литературными данными, согласно которым лучшим связыванием из двух представленных пептидов при пониженных значениях pH обладает ATRAM.

При *ex vivo* изучении распределения конструкции mCherry-16-ATRAM на моделях мышей с опухолью EMT6 через 3 часа после введения наблюдалось ее преимущественное накопление в почках, что обусловлено неоптимальным размером mCherry-16-ATRAM (~33 кДа, табл. 4) и характерно для белковых конструкций, обладающих массой < 60 кДа. Значительное накопление данной конструкции было обнаружено в опухолях модельных

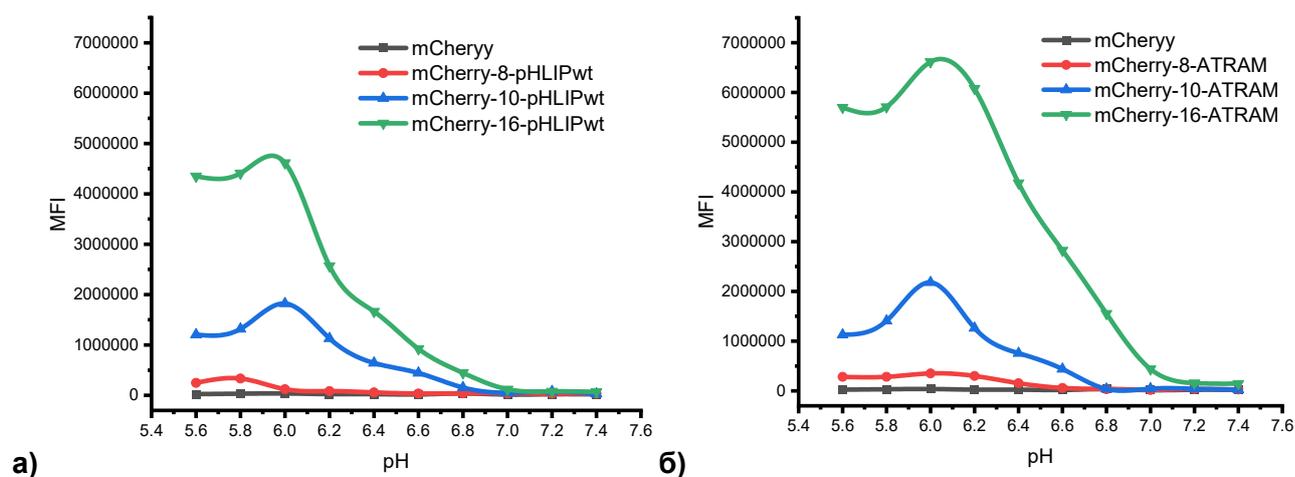


Рисунок 9. Связывание гибридных конструкций mCherry/pHILPwt (а) и mCherry/ATRAM (б) с клетками HeLa при разных значениях pH в сравнении с mCherry.

животных, чего не наблюдалось в случае других жизненно важных органов (рис. 10 и 11). Контрольный белок mCherry также преимущественно локализовался в почках, и наблюдалось его накопление и в опухоли, что может быть обусловлено эффектом увеличенной проницаемости и удерживания веществ. Тем не менее, аккумуляция mCherry-16-ATRAM в опухоли в сравнении с mCherry была более эффективной.

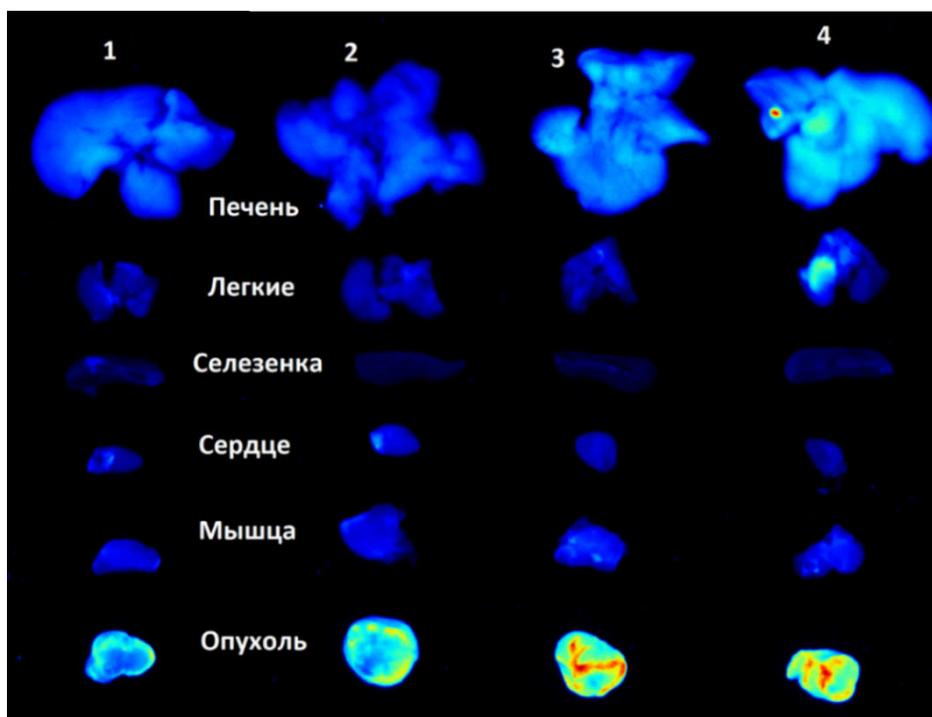


Рисунок 10. *Ex vivo* исследование распределения mCherry (1, 2) и mCherry-16-ATRAM (3, 4) в организме модельного животного после трех часов с момента инъекции.

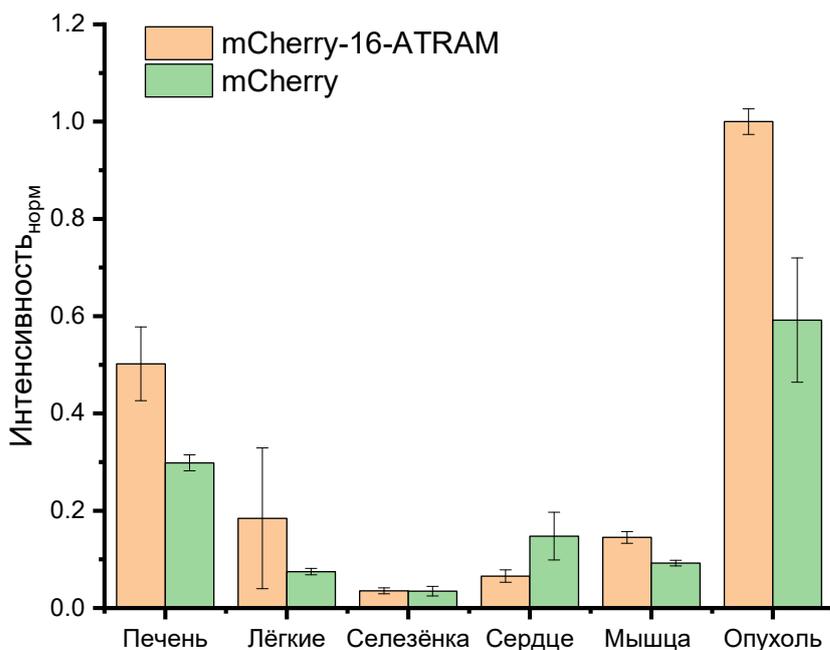


Рисунок 11. Распределение mCherry-16-ATRAM и mCherry в органах модельных животных после трех часов с момента инъекции (нормировка на максимальное значение интенсивности флуоресценции).

Влияние природы нагрузки на pH-специфичность пептида ATRAM

На основе пептида ATRAM был получен набор конъюгатов с различными низкомолекулярными красителями на основе молекул BODIPY: BODIPY-FL (BDP-FL) и BODIPY-R6G (BDP-R6G), не проявляющих токсичных свойств. Красители BODIPY являются гидрофобными молекулами и способны к неспецифичному накоплению в клеточной мембране или иных органеллах, поэтому также был использован и гидрофильный краситель – водорастворимая флуоресцентная метка sulfo-Cy5, не обладающая побочным связыванием с клетками. Все полученные конъюгаты связывалась с клетками при нейтральном и пониженном значениях pH (рис. 12), однако более интенсивный сигнал наблюдался при pH 6.2. Неспецифичное взаимодействие ATRAM-sulfo-Cy5 и других конъюгатов с клетками при нейтральном значении pH обусловлено гидрофобной природой pH-чувствительного пептида.

На основе наиболее удачной конструкции mCherry-16-ATRAM, содержащей Cys в последовательности линкера, был получен ее конъюгат с малеимидным производным

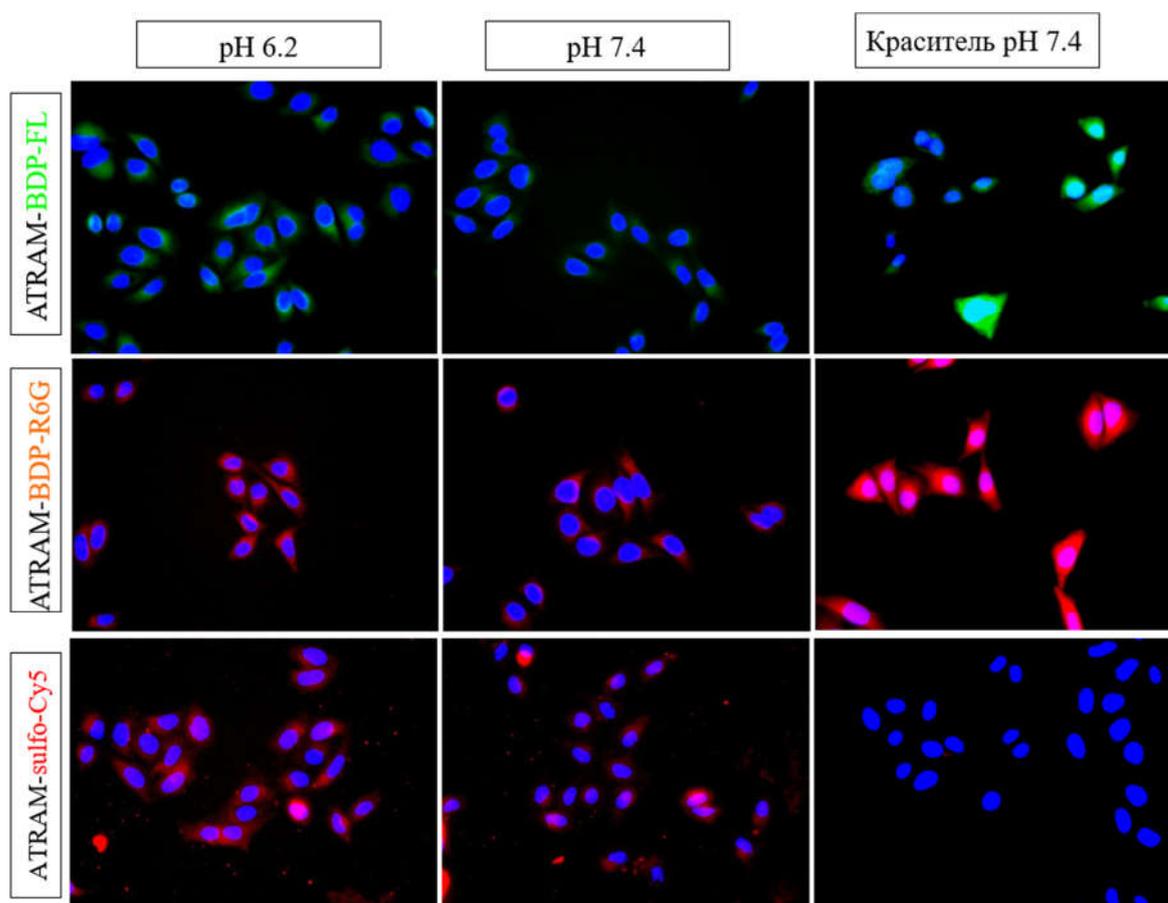


Рисунок 12. Связывание ATRAM-BDP-FL, ATRAM-BDP-R6G, ATRAM-sulfo-Cy5 с клетками HeLa при разных значениях pH в сравнении со свободным красителем.

BODIPY-R6G и изучены pH-зависимые свойства. В случае mCherry-16-BDP-R6G-ATRAM наиболее эффективное связывание наблюдалось при pH 6.8 (рис. 13б), тогда как конструкция до мечения демонстрировала наибольшую эффективность связывания при pH 6.2 (рис. 13а). В отличие от конъюгатов пептида ATRAM с красителями BODIPY, конструкция mCherry-16-BDP-R6G-ATRAM не связывалась с клетками при pH 7.0-7.4.

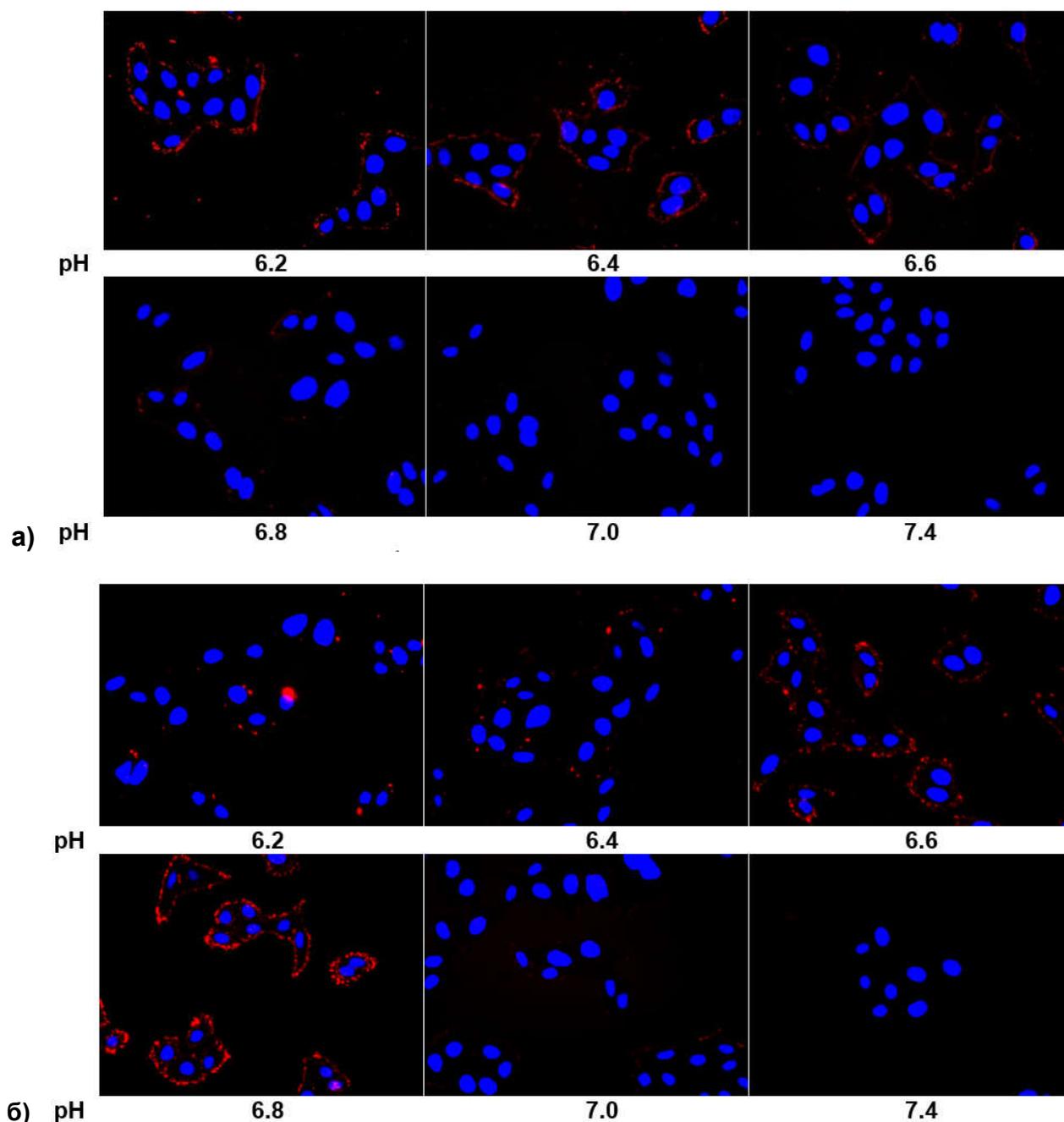


Рисунок 13. Связывание mCherry-16-ATRAM (а) и mCherry-16-BDP-R6G-ATRAM (б) с клетками HeLa при разных значениях pH.

Новый подход к получению оптимальных конструкций белков с пептидами pHILIP

На основе конструкций mCherry-SGLRSRAE-ATRAM (mCherry-8-ATRAM) и ATRAM-GSASGSAS-EGFP (ATRAM-8-EGFP), демонстрирующих низкую эффективность связывания с раковыми клетками при понижении pH, была получена новая, в которой N- и C-конец пептида ATRAM несли флуоресцентные белки mCherry и EGFP, соответственно (mCherry-8-ATRAM-8-EGFP, рис. 14) Предполагалось, что использование сразу двух белковых компонентов со стабильной третичной структурой позволит увеличить доступность гидрофобного пептида для клеточной мембраны и внесет стерические затруднения для его воздействия с этими же белковыми компонентами.

При анализе гибридных конструкций методом спектрометрии было обнаружено, что степень синтеза хромофоров при сравнении гибридных конструкций с одним ФБ и двумя уменьшилась с 81 до 54% для EGFP и с 98 до 65% для mCherry (табл. 5).

Было установлено, что конструкция, несущая на обоих концах пептида ATRAM белковые матрицы, связывалась практически в 20 раз эффективнее исходных, несущих одну молекулу ФБ (рис. 15, 16). Процесс связывания mCherry-8-ATRAM при понижении pH характеризовался значением pKa 6,4, что соотносилось с литературными данными, и выходом на плато при pH ниже 6,2. Однако в случае конструкции mCherry-8-ATRAM-8-EGFP pKa данного процесса сдвинулось в сторону физиологического значения pH и составило 6,8, а выход связывания на плато наблюдался при pH ниже 6,6 (рис. 15a).

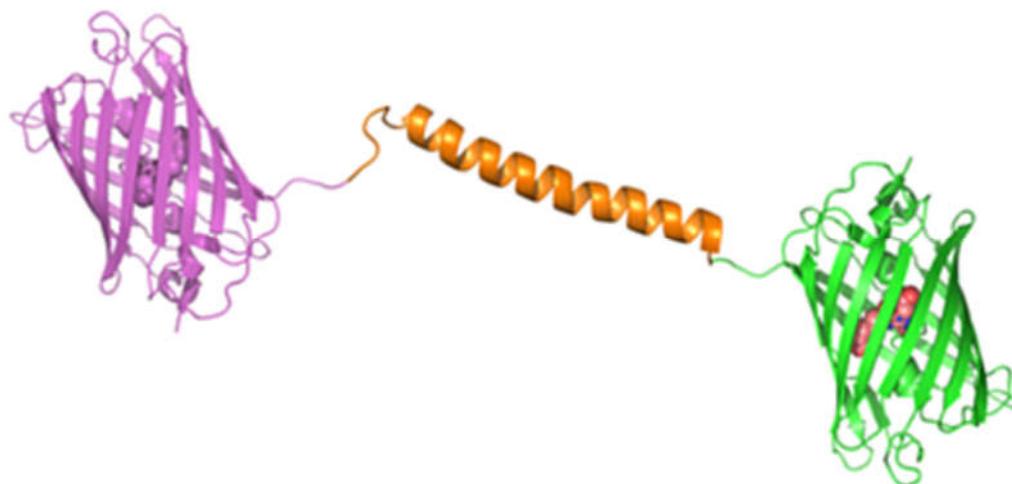


Рисунок 14. Модель пространственной структуры гибридной конструкции mCherry-8-ATRAM-8-EGFP

Таблица 5. Свойства гибридных конструкций.

№	Конструкция	$\epsilon_{280}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Степень созревания хромофора, %	Степень созревания хромофора относительно ФБ, %	Молекулярный вес, Да
1	ATRAM-8-EGFP	25 900	62	81	31 044
2	mCherry-8-ATRAM	39 880	74	98	32 170
3	mCherry-8-ATRAM-8-EGFP	60 280	EGFP: 41	EGFP: 54	58 474
			mCherry: 49	mCherry: 65	
4	EGFP (контроль)	20 400	77	100	27 429
5	mCherry (контроль)	34 380	76	100	27 990

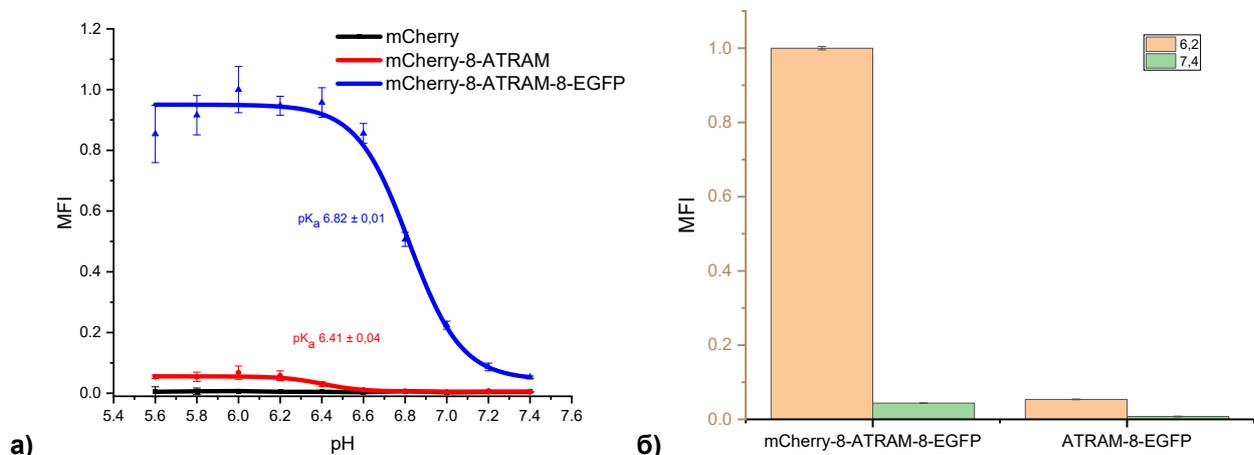


Рисунок 15. Исследование гибридных конструкций при помощи цитофлуориметрии. (а) Кривые связывания mCherry-8-ATRAM и mCherry-8-ATRAM-8-EGFP с клетками HeLa при разных значениях pH в сравнении с mCherry (нормировка на максимальное значение интенсивности флуоресценции MFI в отдельном эксперименте, детекция сигнала от mCherry). (б) Гистограммы связывания mCherry-8-ATRAM-8-EGFP и ATRAM-8-EGFP с клетками HeLa при разных значениях pH (нормировка на максимальное значение интенсивности флуоресценции MFI в отдельном эксперименте, детекция сигнала от EGFP).

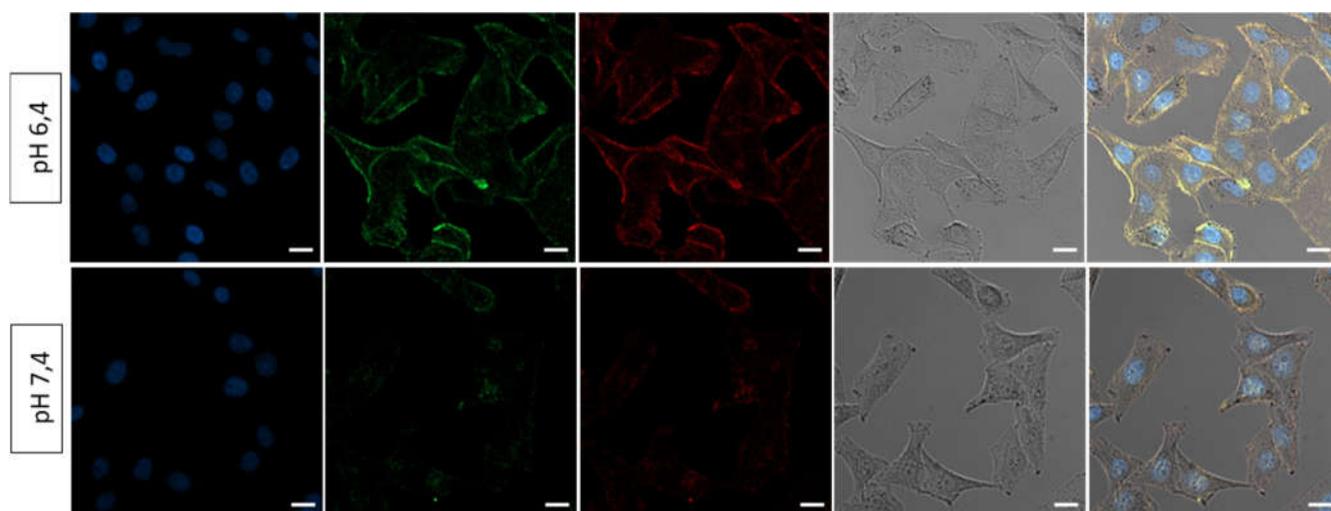


Рисунок 16. pH-зависимое связывание конструкции mCherry-8-ATRAM-8-EGFP с клетками HeLa. Масштабный отрезок 20 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования был получен ряд гибридных конструкций на основе флуоресцентных белков, в том числе и фототоксичных, и пептидов семейства рНЛIP и проведено подробное систематичное изучение их свойств. В качестве белковых молекул были выбраны именно ФБ, поскольку 1) они исходно обладают довольно стабильной третичной структурой, 2) по эффективности созревания хромофора можно судить об эффективности их фолдирования в составе гибридных конструкций и о степени влияния пептидов рНЛIP на первоначальные свойства белковой составляющей, 3) могут выполнять функцию флуоресцентной метки для визуализации рН-зависимой таргетной доставки.

В результате выполненного исследования был выявлен ряд факторов, влияющих на эффективность рН-зависимого связывания полученных гибридных конструкций с клетками. Были предложены новые подходы, позволяющие повысить эффективность данных препаратов. Показано, что при разработке белковых гибридных конструкций с использованием рНЛIP для применения в диагностических, терапевтических или тераностических целях необходимо учитывать то, что их эффективность может быть снижена за счет влияния рНЛIP на фолдирование белкового компонента. Вместе с тем, мечение гидрофобными низкомолекулярными соединениями может сдвигать рН-зависимый процесс встраивания в клеточную мембрану в сторону более физиологических значений рН. Представленные в данной работе результаты, вероятно, позволят заполнить пробелы в понимании верной стратегии при получении в дальнейшем оптимальных гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP для противораковой терапии.

ВЫВОДЫ

1. Получен и подробно изучен ряд гибридных конструкций на основе флуоресцентных белков и нескольких пептидов семейства рНЛIP. Установлено, что гибридные конструкции на основе различных пептидов рНЛIP обладают разной эффективностью связывания при понижении рН. Обнаружено влияние последовательности пептидов рНЛIP на фолдирование белкового компонента в составе гибридной конструкции.
2. На основе выявленных закономерностей предложены новые подходы для получения конструкций, способных к эффективному связыванию с раковыми клетками при понижении рН. Эти подходы основаны на выборе оптимального линкера, соединяющего белковый и рН-чувствительный компоненты, а также заключении

пептида рНЛIP между двумя белковыми компонентами (т.е. получение конструкции вида белок-рНЛIP-белок).

3. Продемонстрирован потенциал применения рНЛIP-технологии в сочетании с белковыми молекулами на примерах флуоресцентных белков, обладающих в том числе и фототоксичными свойствами, на моделях *in vivo* и *in vitro*.
4. Обнаруженное в предыдущих работах неспецифичное связывание конъюгатов рНЛIP с низкомолекулярными метками при физиологическом значении рН обусловлено гидрофобностью пептидов семейства рНЛIP. Введение компонента в виде ФБ увеличивает общую гидрофильность гибридной конструкции и приводит к связыванию только при пониженных значениях рН. Мечение белково-пептидных рН-чувствительных конструкций гидрофобной низкомолекулярной меткой вблизи последовательности рНЛIP не влияет на специфичность, однако приводит к сдвигу константы кислотно-основного равновесия в сторону физиологических значений рН.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей:

1. A.Y. Frolova, A.A. Pakhomov, D. L. Kakuev, A.S. Sungurova, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Cancer cells targeting with genetically engineered constructs based on a pH-dependent membrane insertion peptide and fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022, 612, 141-146.
2. A.Y. Frolova, A.A. Pakhomov, D. L. Kakuev, A.S. Sungurova, A.A. Dremina, E.D. Mamontova, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Hybrid protein-peptide system for the selective pH-dependent binding and photodynamic ablation of cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2023, 249, 112803.
3. A.Y. Frolova, A.A. Pakhomov, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Influence of Peptide Linkers on the Functional Properties of Hybrid Structures with Selective pH-Dependent Binding to Cancer Cells. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2024, 50, 1141–1149.

Список тезисов конференций:

1. А.Ю. Фролова, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Разработка и изучение белковых структур для тераностики раковых заболеваний // XXVII Международная конференция

- студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2020, тезисы докладов.
2. А.Ю. Фролова, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Гибридные конструкции на основе пептида рНЛIP и флуоресцентных белков для адресной доставки к раковым клеткам и их элиминации в условиях ацидоза // XXXIII зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2021, тезисы докладов, с. 226.
 3. А.Ю. Фролова, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Получение гибридных структур на основе флуоресцентных красителей и пептидов рНЛIP для адресной доставки к раковым клеткам // XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2021, тезисы докладов.
 4. А.Ю. Фролова, Сунгурова А.С., А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Получение оптимальной гибридной конструкции на основе флуоресцентного белка mCherry и рН-чувствительного пептида для тераностики рака // XXXIV зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2022, тезисы докладов, с. 157.
 5. Сунгурова А.С., А.Ю. Фролова, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Изучение и сравнение рН-зависимых свойств химерных конструкций на основе флуоресцентного белка EGFP и пептидов рНЛIP // XXXIV зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2022, тезисы докладов, с. 154.