

На правах рукописи

ЧУБАРОВ АЛЕКСЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЗОНДЫ НА ОСНОВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО  
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ  
ТОМОГРАФИИ И МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ НА  
ЯДРАХ  $^{19}\text{F}$**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

**Годовикова Татьяна Сергеевна**, д.х.н., доцент

Официальные оппоненты:

**Григорьев Игорь Алексеевич**, д.х.н., профессор  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова  
СО РАН, зав. лабораторией

**Франк Людмила Алексеевна**, д.б.н.  
Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный  
центр СО РАН», в.н.с.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и  
Ю. А. Овчинникова РАН

Защита состоится «21» декабря 2016 г. в 12:00 часов  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090 Новосибирск, проспект  
академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также на сайте  
[www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» ноября 2016 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Известная структура человеческого сывороточного альбумина, возможность получения рекомбинантного белка, его высокая устойчивость в широком диапазоне pH, температуры и в разных растворителях, делают его привлекательным кандидатом для использования в качестве биосовместимого носителя в дизайне визуализирующих систем для исследования патологических процессов (Chen et al., 2016; Liu et al., 2016). Природный стерический барьер затрудняет удаление альбумина в водных средах ретикулоэндотелиальной системой, что приводит к пролонгированному времени циркуляции в кровотоке без нежелательных печенъ-специфических аккумуляций и дает возможность использовать сосудистые дефекты солидных опухолей для пассивного накопления в них препаратов на основе альбумина через феномен, известный как эффект повышенной проницаемости и удерживания (EPR-эффект) (Larsen et al., 2016). Было показано, что аккумуляция наночастиц альбумина с лекарственным препаратом в опухолевых клетках может быть обусловлена трансцитозом в интерстициальное пространство опухоли, который инициируется связыванием альбумина с албондином с последующим взаимодействием с рецептором SPARC (Bern et al., 2015). Благодаря альбумину облегчается направленная транспортировка в опухоль агентов для томографии, что крайне важно для ранней диагностики заболевания и мониторинга противоопухолевой терапии.

Подробная информация об опухоли необходима для точного определения локализации злокачественных областей и выбора оптимальной стратегии при хирургическом лечении. Это особенно остро требуется в случае опухолей головного мозга, для которых полностью хирургически удалить опухоли довольно трудно. Хирургия мозга, использующая метод флуоресцентной томографии, является новым признанным методом лечения пациентов с глиомой (Acerbi et al., 2014; Su et al., 2014). Она предоставляет возможность лучше определять границы опухоли, что позволяет достигнуть максимального терапевтического эффекта и уменьшить вредное воздействие. Однако оптические методы диагностики малоприменимы для клинических исследований ввиду ограничения по глубине детекции мишени. Сочетание флуоресцентной визуализации с предоперационной магнитно-резонансной томографией (МРТ) позволяет существенно улучшить разрешение и глубину визуализации. В настоящее время в клинике при проведении исследований с помощью МРТ используют преимущественно контрастные препараты на основе  $Gd^{3+}$ . Однако их применение небезопасно из-за высвобождения токсичных ионов  $Gd^{3+}$  в кровеносное русло (Rogosnitzky et al., 2016). Перечисленные выше факторы, необходимость проведения сложного многостадийного синтеза контрастирующих конъюгатов и их высокая цена, накладывают ограничения на применение комплексов  $Gd^{3+}$  для диагностики. Таким образом, вопрос разработки на основе альбумина визуализирующих систем, содержащих в качестве магнитно-резонансной метки другие ядра, остается открытым.

Проблемой регистрации ядер, отличных от  $^1H$ , является низкая чувствительность. Лишь для  $^{19}F$  она сопоставима с  $^1H$ . В организме человека

структуры на основе  $^{19}\text{F}$  присутствуют исключительно в форме твердых солей, для которых сигнал магнитного резонанса трудно детектируем. Отсутствие фонового сигнала потенциально обеспечивает для молекулярной томографии на ядрах  $^{19}\text{F}$  в организме высокое отношение сигнала к шуму и специфичность. Представляется актуальным разработка систем прижизненной мультимодальной молекулярной визуализации анатомических структур, маркированных путем доставки экзогенных меток ( $^{19}\text{F}$  ЯМР метки и флуорофор) в составе зондов на основе альбумина. Такие системы крайне необходимы для получения подробной информации об опухоли с целью определения точной локализации злокачественных областей и контроля результатов противоопухолевой терапии.

**Цель настоящей работы** – разработка подходов к созданию новых мультимодальных зондов на основе человеческого сывороточного альбумина, содержащих магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ) и флуорофор, для прижизненной визуализации злокачественных опухолей.

В ходе исследования решались следующие задачи:

- дизайн и синтез фторсодержащих производных тиолактона гомоцистеина для сайт-специфического введения в человеческий сывороточный альбумин магнитно-резонансной метки (ядра  $^{19}\text{F}$ );
- *N*-гомоцистеинилирование очищенного человеческого сывороточного альбумина и альбумина в составе белков плазмы крови с использованием аналогов природного модификатора – производных тиолактона гомоцистеина, содержащих  $^{19}\text{F}$  ЯМР метку;
- сравнительный анализ физико-химических свойств и биосовместимости альбумина и конъюгатов альбумина, содержащих  $^{19}\text{F}$  ЯМР метку;
- разработка способа введения  $^{19}\text{F}$  ЯМР метки и флуорофора в очищенный человеческий сывороточный альбумин и альбумин в составе плазмы крови;
- изучение физико-химических свойств и биосовместимости мультимодальных зондов на основе альбумина, содержащих  $^{19}\text{F}$  ЯМР метку и флуорофор;
- демонстрация потенциальной возможности использования созданных мультимодальных зондов для прижизненной молекулярной визуализации экспериментальной опухоли тандемом физических методов ( $^{19}\text{F}$  МРТ, компьютерная и оптическая томографии).

#### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Продемонстрировано, что использование при *N*-гомоцистеинилировании альбумина впервые синтезированных производных тиолактона гомоцистеина, содержащих остатки фторорганических соединений, обеспечивает возможность сайт-специфического введения магнитно-резонансной метки (ядра  $^{19}\text{F}$ ) по определенным остаткам лизина на белке. Обнаружено, что блокирование аминогруппы гомоцистеина остатками фторорганических соединений приводит к ингибированию генерирования гомоцистеинамидами альбумина свободных радикалов, а также предотвращает образование токсичных высокомолекулярных агрегатов. Показано, что путем селективного введения по остатку Cys-34 альбумина флуоресцентной метки с использованием малеимидного производного красителя и последующего ацилирования производными тиолактона

гомоцистеина, содержащими остатки фторорганических соединений, можно получить биосовместимые бимодальные зонды.

Разработанный в настоящей работе подход к декорированию альбумина разным типом меток может способствовать созданию новых платформ для тераностики злокачественных опухолей, а система прижизненной мультимодальной молекулярной визуализации злокачественных опухолей, маркированных путем доставки экзогенных меток ( $^{19}\text{F}$  ЯМР метка и флуорофор) в составе мультимодальных зондов, должна значительно повысить степень радикальности удаления опухолей и одновременно безопасности хирургического этапа лечения.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. На основе тиолактона гомоцистеина получены и охарактеризованы молекулярные зонды, в структуре которых присутствуют: а) остаток тиолактона, реакционноспособный в отношении  $\varepsilon$ -аминогруппы лизина в белках; б) остатки трифторацетата/перфтортолуола/ перфторксилола, обеспечивающие регистрацию соединений методом спектроскопии  $^{19}\text{F}$  ЯМР.

2. Посттрансляционная модификация белков – *N*-гомоцистеинилирование – при использовании аналогов природного модификатора – фторпроизводных тиолактона гомоцистеина, обеспечивает введение магнитно-резонансной метки (ядра  $^{19}\text{F}$ ) в очищенный человеческий сывороточный альбумин, а также в альбумин в составе белков плазмы крови. Введение метки происходит сайт-специфически, сайты совпадают с таковыми, характерными для природной модификации белка тиолактоном гомоцистеина *in vivo* и *in vitro*. Отличительной особенностью конъюгатов альбумина, содержащих  $^{19}\text{F}$  ЯМР метки, является то, что блокирование аминокрупп остатков гомоцистеина путем присоединения к ним фторорганических соединений, приводит к ингибированию образования гомоцистамидами альбумина реакционноспособных свободных карборадикалов, а также затормаживает формирование их патогенных агрегатов, что свойственно для белков, *N*-гомоцистеинилированных *in vivo*.

3. Путем селективной модификации остатка Cys-34 человеческого сывороточного альбумина малеимидным производным флуоресцентного красителя (Cy5 или Cy7) и последующего *N*-гомоцистеинилирования производными тиолактона гомоцистеина, содержащими остатки фторорганических соединений, получены биосовместимые бимодальные молекулярные зонды, детектируемые с помощью магнитно-резонансной томографии/магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах  $^{19}\text{F}$  и флуоресцентной томографии (FLECT/CT). Разработанный метод позволяет не только получать бимодальный зонд на основе очищенного человеческого сывороточного альбумина, но и вводить  $^{19}\text{F}$  ЯМР метку и флуорофор в альбумин в составе белков плазмы крови. Применение бимодального зонда в качестве контрастного агента в экспериментах на мышцах SPF-статуса линии SCID с опухолью головного мозга, вызванной внутричерепной инъекцией клеточной культурой глиомы U87 человека, позволяет визуализировать экспериментальную глиому.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 4 работы, из них: 2 научные статьи в международных

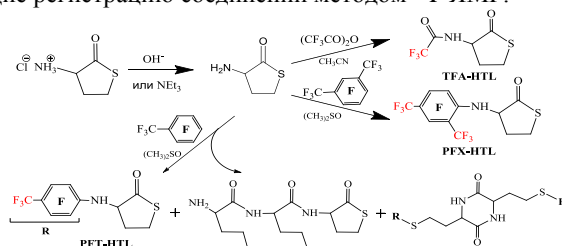
рецензируемых журналах, индексируемые в Web of Science и Scopus, 1 обзор и 1 патент. Основные положения работы представлены и обсуждены на 14 российских и международных конференциях, в том числе: на международном кластере конференций международной конференции «ОРГХИМ-2016» (Санкт-Петербург, 2016), материалы которой индексируются в РИНЦ, международной конференции «Химическая биология» (Новосибирск, 2016), на IV и III школах конференций «Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics» (Новосибирск, 2016 и 2014), VI всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» (Санкт-Петербург, 2012), на международной конференции «Medicinal Chemistry Conference», (Испания, Ланзароте, 2012), II международной научной конференции «Physico-Chemical Biology» (Новосибирск, 2011), V всероссийской конференции «Национальное достояние России» (Москва, 2011), международном симпозиуме «Advanced science in organic chemistry» (Крым, Мисхор, 2010), на международных научных конференциях “Студент и научно-технический прогресс” (Новосибирск, 2013, 2012, 2011, 2010).

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, списка публикаций по теме работы, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 142 страницах, не включая приложения, содержит 38 рисунков и 14 таблиц. Библиография включает 254 литературных источника.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

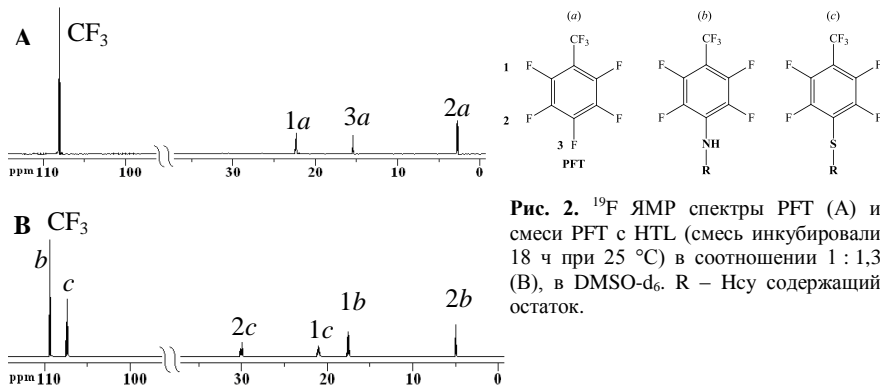
### 1. Синтез производных тиолактона гомоцистеина (НТЛ), содержащих магнитно-резонансную метку (ядра $^{19}\text{F}$ )

С целью получения на основе НТЛ ацилирующих контрастных агентов, содержащих магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ), на первой стадии данной работы были разработаны способы модификации аминогруппы НТЛ путем присоединения к ней остатков фторорганических соединений. Ниже (Рис. 1), представлена обобщенная схема, согласно которой были получены молекулярные зонды (TFA-НТЛ, PFT-НТЛ и PFX-НТЛ), в структуре которых присутствуют: а) остаток тиолактона, реакционноспособный в отношении  $\varepsilon$ -аминогруппы лизина в белках; б) остатки трифторацетата/перфтортолуола/ $m$ -перфторксилола, обеспечивающие регистрацию соединений методом  $^{19}\text{F}$  ЯМР.



**Рис. 1.** Схема получения производных тиолактона гомоцистеина, содержащих остатки фторорганических соединений. Структура соединений подтверждена с помощью методов  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  ЯМР и электронной спектроскопии, ESI масс-спектрометрии.

Одним из подходов для получения на основе НТЛ молекулярных зондов, содержащих магнитно-резонансные метки (ядра  $^{19}\text{F}$ ), может быть нуклеофильное ароматическое замещение атома фтора перфторароматического соединения аминогруппой НТЛ по механизму  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ . За протеканием процесса следили с помощью метода  $^{19}\text{F}$  ЯМР-спектроскопии. При взаимодействии в DMSO перфтортолуола (PFT) со свободным основанием НТЛ в молярном соотношении 1:1,3 через 5–20 мин в спектре  $^{19}\text{F}$  ЯМР наряду с исходными сигналами PFT регистрировали сигналы новых соединений. Через 18 ч сигналы исходного PFT в спектре не наблюдались, что указывает на завершение процесса. (Рис. 2).



**Рис. 2.**  $^{19}\text{F}$  ЯМР спектры PFT (А) и смеси PFT с НТЛ (смесь инкубировали 18 ч при 25 °С) в соотношении 1 : 1,3 (В), в DMSO- $d_6$ . R – Hсу содержащий остаток.

Анализ спектров  $^{19}\text{F}$  ЯМР указывает на образование двух типов соединений. Смещение сигнала  $2a$  исходного перфтортолуола (атомы фтора в *орто*-положении) в слабое поле (сигнал  $2c$ ) указывает на образование *S*-замещенного производного перфтортолуола (*c*) (рис. 2). Зарегистрированный сигнал  $2b$  может соответствовать *N*-замещенному производному перфтортолуола (*b*) (Рис. 2). Оба соединения дают очень близкие сигналы атомов фтора  $\text{CF}_3$ -групп:  $\delta \sim 107$  м.д. По соотношению интенсивности сигналов атомов фторов (2:2:3) можно заключить, что нуклеофильное замещение фтора в PFT протекает в *n*-положение. Последующее разделение соединений хроматографией на силикагеле и их анализ с привлечением методов  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  ЯМР и электронной спектроскопии, ESI масс-спектрометрии позволили установить, что основным продуктом реакции является *N*-(*n*-перфтортолил)-НТЛ (PFT-НТЛ, Рис. 1). В меньшей степени (~30%) образуется бис(*S*-*n*-перфтортолил)-2,5-дикетопиперазин гомоцистеина и *S*-*n*-перфтортолил производное трипептида гомоцистеина. Последнее указывает на то, что в условиях реакции происходит ацилирование одной молекулы НТЛ аминогруппы другой, что и приводит к образованию димера гомоцистеинил-НТЛ. Данный димер может взаимодействовать с третьей молекулой НТЛ с образованием трипептида или реагировать по реакции внутримолекулярного аминолиза с образованием производного 2,5-дикетопиперазина (Рис. 1). В дальнейшем SH группы пептидов могут арилироваться с помощью PFT. Следует отметить, что образование трипептида, содержащего тиолактоновый цикл, при аминолизе НТЛ впервые зарегистрировано в данной работе. К настоящему моменту не имеется подтверждения или опровержения его образования *in vivo*,

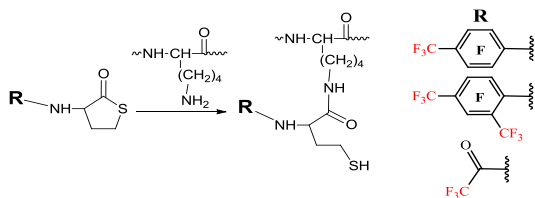
что, возможно, связано с его низкой концентрацией и отсутствием соответствующих чувствительных методов детекции.

Необходимо обратить внимание на то, что выход целевого продукта реакции при синтезе PFT-HTL зависит от условий перевода хлоргидрата HTL в свободное основание. Так, депротонирование аминогруппы HTL путем добавления в реакционную смесь триэтиламина приводит к повышению выхода целевого продукта (PFT-HTL) до 86%. В то время как, проведение синтеза PFT-HTL с использованием свободного основания HTL, полученного путем экстракции его из щелочного водного раствора, не превышает 57%. В случае использования более сильного электрофильного реагента по сравнению с PFT, *m*-перфторксилола (PFX), также, как и в случае реакции с трифторуксусным ангидридом, удается избежать накопления продуктов ацилирования между молекулами HTL в растворе DMSO, при этом целевые продукты реакции PFX-HTL или TFA-HTL (Рис. 1) были получены с выходами ~ 90% и 95%, соответственно.

Производные тиолактона гомоцистеина, содержащие остатки фторорганических соединений (TFA-HTL, PFT-HTL и PFX-HTL), в условиях, приближенных к физиологическим, гидролизуются довольно медленно (например,  $\tau_{0,5} = 23,8$  ч для TFA-HTL, буфер PBS pH 7,4) и, при этом, обладают растворимостью, достаточной для получения их конъюгатов с белками.

## 2. Декорирование человеческого сывороточного альбумина магнитно-резонансными метками (ядра $^{19}\text{F}$ )

Учитывая высокую ацилирующую способность тиолактонового цикла по отношению к остаткам лизина альбумина, в настоящей работе для получения на основе HSA молекулярных зондов, содержащих магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ), предложен подход, основанный на *N*-гомоцистеинилировании альбумина в присутствии аналогов природного модификатора – производных HTL, содержащих остатки фторорганических соединений. Схема процесса декорирования альбумина  $^{19}\text{F}$  ЯМР метками представлена на Рис. 3. Реакцию *N*-гомоцистеинилирования HSA с использованием производных TFA-HTL, PFT-HTL и PFX-HTL проводили в условиях, приближенных к физиологическим (буферный раствор PBS, pH 7,4, 37°C). Полученные конъюгаты белка были очищены от избытка низкомолекулярных реагентов центрифугированием через фильтры «Centricon». Выход белков, содержащих  $^{19}\text{F}$  ЯМР метку, оказался равным ~ 90%. Для последующего сравнительного анализа физико-химических свойств, дополнительно были получены гомоцистеинилированные формы белка, не содержащие  $^{19}\text{F}$ -метки (Hcy-HSA и  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{-Hcy-HSA}$ ).

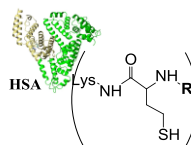
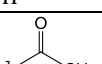
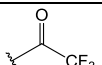
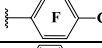
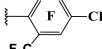


**Рис. 3.** Схема получения конъюгатов HSA, содержащих  $^{19}\text{F}$  ЯМР метки



В Таблице 1 приведены некоторые характеристики полученных в данной работе конъюгатов альбумина. Как видно, независимо от типа производных НТЛ, происходит нуклеофильная атака карбонильного атома углерода тиолактона  $\varepsilon$ -аминогруппой лизина, приводящая к раскрытию тиолактонового цикла и образованию дополнительной сульфгидрильной группы. Степень модификации альбумина была определена с помощью метода масс-спектрометрии (путем сравнения молекулярных масс с массой нативного HSA), а также титрованием свободных сульфгидрильных групп с помощью реагента Элмана.

Таблица 1  
Характеристики нативного HSA и конъюгатов альбумина, полученных в процессе N-гомоцистиенилирования с различными производными НТЛ

Структура	R	SH группы*	М, кДа	n	аббревиатура
	H	$3,46 \pm 0,05$	66,80	$2,8 \pm 0,1$	Hcy-HSA
		$3,3 \pm 0,1$	66,91	$2,6 \pm 0,1$	CH <sub>3</sub> C(O)-Hcy-HSA
		$3,7 \pm 0,1$	67,11	$3,0 \pm 0,1$	TFA-Hcy-HSA
		$3,8 \pm 0,1$	67,5	$3,1 \pm 0,1$	PFT-Hcy-HSA
		$3,67 \pm 0,05$	67,65	$3,0 \pm 0,1$	PFX-Hcy-HSA
-	-	0,67	66,5	-	HSA

\*рассчитано на 1 молекулу белка

Спектры  $^{19}\text{F}$  ЯМР полученных фтормеченных конъюгатов PFT-Hcy-HSA, PFX-Hcy-HSA и TFA-Hcy-HSA представлены на Рис. 4.

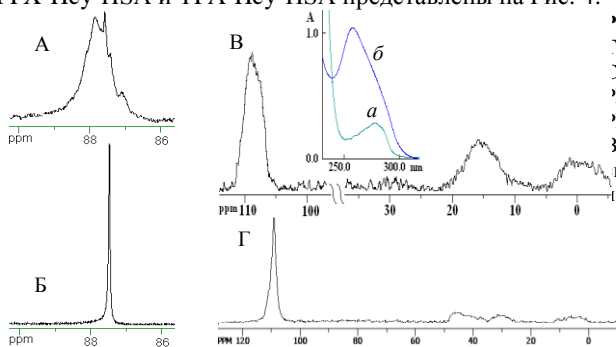


Рис. 4 – Спектры  $^{19}\text{F}$  ЯМР TFA-Hcy-HSA (0,3 мМ) (А),  $\text{F}_3\text{COONa/HSA}$  (0,3 мМ) (Б), PFT-Hcy-HSA (0,1 мМ) (В), PFX-Hcy-HSA (0,1 мМ) (Г). Вставка (В): электронные спектры поглощения HSA (а) PFT-Hcy-HSA (б) Все растворы в PBS pH 7,4.

В спектре ЯМР  $^{19}\text{F}$  конъюгата TFA-Hcy-HSA (Рис. 4 А) регистрируется сигнал в области 88 м.д. Для сравнения приведен спектр ЯМР  $^{19}\text{F}$  смеси HSA с трифторацетатом (Рис. 4 Б). Видно, что при присоединении трифтоацетильной группировки к белку, ширина сигнала увеличивается, что может свидетельствовать о сокращении времени поперечной релаксации  $T_2$  регистрируемых ядер. Это, вероятно, обусловлено уменьшением подвижности в

конъюгате остатка трифторацетата. Ранее, в работе (Mehta et al., 1994), было показано, что у присоединенного к белкам остатка трифторацетата время релаксации  $T_2 \sim 70$  мс, что значительно меньше, чем у низкомолекулярных фторорганических молекул ( $T_2 \sim 760$  мс). Так как времена релаксации являются важными параметрами в методе МРТ, уменьшение значения  $T_2$  может оказывать существенное влияние на амплитуду сигнала (отношение сигнал/шум) при проведении исследований в органах и тканях животных.

В спектре  $^{19}\text{F}$  ЯМР конъюгатов PFT-Нсу-HSA и PFX-Нсу-HSA (Рис. 4 В и Г, соответственно) наблюдаются сигналы в области  $\sim 110$  м.д. ( $\text{CF}_3$ ) и 0-40 м.д. (сигналы фторов ароматического кольца). Ширина сигналов при присоединении остатка перфтортолуола (PFT) или перфторсилола (PFX) к белку существенно увеличивается, что, как и в случае с конъюгатом TFA-Нсу-HSA, может указывать на сокращении времени поперечной релаксации  $T_2$ . Следует отметить, что для дальнейших  $^{19}\text{F}$  МРТ исследований более предпочтительным является наиболее интенсивный и узкий сигнал  $\text{CF}_3$  групп при 110 м.д. Присутствие остатка PFT или PFX в составе конъюгатов альбумина может быть легко обнаружено с помощью электронной спектроскопии. В УФ-спектре PFT-Нсу-HSA (Рис. 4 В, вставка) наблюдается появление максимума поглощения при длине волны 256 нм, который характерен для *N*-замещенного PFT. На основании значения коэффициента молярного поглощения *N*-замещенного PFT, можно сделать вывод о присоединении к белку 3-х остатков PFT.

### 3. Сравнение физико-химических характеристик гомоцистеинамидов альбумина, блокированных по аминокгруппе остатка гомоцистеина, с *N*-гомоцистеинилированным альбумином

Принимая во внимание, что *N*-гомоцистеинилирование белков нарушает их функции и может привести к развитию патологических процессов в организме человека (Sharma et al., 2015; Jakubowski H., 2013), задачей следующего этапа работы было проведение сравнительного анализа физико-химических свойств нативного и различных конъюгатов HSA для оценки безопасности и перспективности  $^{19}\text{F}$  содержащих производных белка для *in vivo* исследований по визуализации опухолей с привлечением метода  $^{19}\text{F}$  МРТ. При *N*-гомоцистеинилировании белков происходит нарушение их пространственной структуры и, как следствие, может происходить формирование патологических агрегатов (Sharma et al., 2015; Paoli P., 2010).

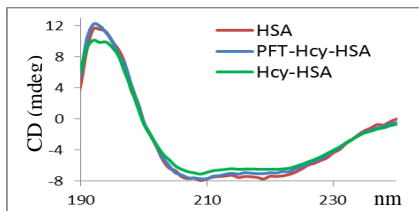


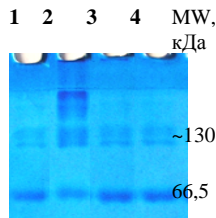
Рис. 5. Спектры кругового дихроизма (CD) HSA (красный), Hсу-HSA (зеленый), PFT-Нсу-HSA (синий) при 25°C.

Изменения пространственной структуры конъюгатов альбумина изучали методами CD-спектроскопии и гель-электрофореза (SDS-PAGE). Как видно из CD-спектра (Рис. 5) модификация остатками Hсу приводит к изменению в спектре в области 208–225 нм и 190–95 нм (данные максимумы в CD-спектре прежде всего соответствуют  $\alpha$ -спиралям в белке). При расшифровке

CD-спектра было обнаружено, что в нативном HSA количество  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев составляет 61% и 9%, соответственно. Реакция *N*-гомоцистеинилирования с получением Hcy-HSA приводит к наиболее существенным изменениям во вторичной структуре белка: количество  $\alpha$ -спиралей уменьшается с 61% до 51%, причем количество  $\beta$ -слоев увеличивается на 1%. Интересно отметить, что модификация альбумина остатками PFT-Hcy или PFX-Hcy не приводит к существенным изменениям в пространственной структуре белка. Для конъюгатов PFT-Hcy-HSA и PFX-Hcy-HSA число процентов  $\beta$ -слоев, при сравнении с нативным альбумином, не изменяется, а количество  $\alpha$ -спиралей уменьшается всего на 4%.

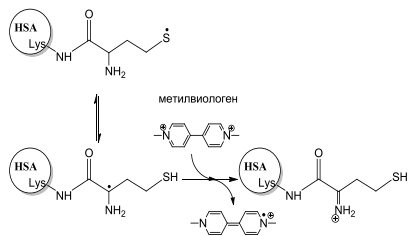
Гель-электрофоретический анализ конъюгатов альбумина PFT-Hcy-HSA (Рис. 6, дор. 1) и TFA-Hcy-HSA (Рис. 6, дор. 3) выявил белковые зоны, которые по электрофоретической подвижности соответствуют мономерному HSA (66,5 кДа) и его димеру (~ 130 кДа) (Рис. 6, дор. 4). В то же время, в случае с *N*-гомоцистеинилированным альбумином (Hcy-HSA) наблюдаются дополнительные полосы, соответствующие материалу с большим молекулярным размером (MW > 130 кДа) (Рис. 6, дор. 2). Полученные результаты указывают на то, что блокирование аминокислотных групп гомоцистеина путем присоединения остатков фторсодержащих соединений, приводит к кардинальным изменениям в свойствах *N*-гомоцистеинилированного альбумина, в частности уменьшается его способность к агрегации, тем самым решается проблема токсичности зонда, разрабатываемого на основе модифицированной формы альбумина.

При разработке молекулярных зондов на основе *N*-гомоцистеинилированных белков, также необходимо учитывать возможность образования свободных радикалов в условиях окислительного стресса (Sibrian-Vazquez *et al.*, 2010). Известно, что *N*-гомоцистеинилированные белки более предрасположены к окислению, чем нативные. Наличие дополнительных тиольных групп на белке делает последний сильным антиоксидантом. Это свойственно как функциональной группе остатка цистеина, так и сульфгидрильной группе Hcy. В то же время, наличие в боковом радикале Hcy дополнительной метиленовой группы приводит к появлению необычных свойств. Было показано, что в условиях окислительного стресса *N*-гомоцистеинилированные белки могут генерировать тиольный радикал который может взаимодействовать с  $\alpha$ -углеродным атомом остатка Hcy с образованием карборадикала (Рис. 7). Последний может быть выявлен с помощью хромофорного окислителя – метилвиологена (Рис. 7). По известной методике (Sibrian-Vazquez M., 2010) в настоящей работе изучалась способность к образованию карборадикалов различными конъюгатами альбумина. Реакционные смеси белка с метилвиологеном подвергали кратковременному нагреванию, что приводило к изменению цвета раствора на синий (Рис. 8, справа). На протекание



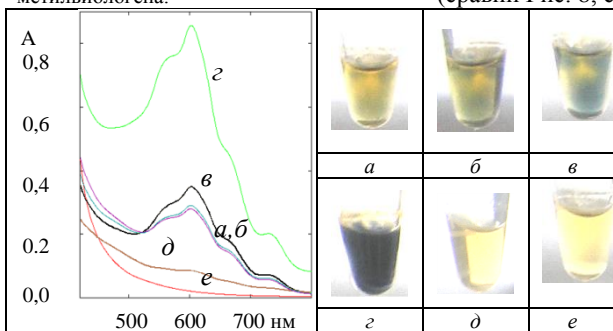
**Рис. 6.** Гель электрофорез гомоцистаминов HSA в условиях Laemmli (7 % SDS-PAGE, без DTT), белковые зоны окрашены кумасси синим. PFT-Hcy-HSA (дор. 1); Hcy-HSA (дор. 2); TFA-Hcy-HSA (дор. 3); HSA (дор. 4).

процесса с образованием катион-радикала также указывают изменения в электронных спектрах поглощения (Рис. 8, слева). Сравнительный анализ



**Рис. 7.** Схема процесса превращения тиильного радикала в карборадикал и определение последнего с помощью метилвиологена.

интенсивности поглощения света с длиной волны, характерной для максимума поглощения продукта восстановления метилвиологена (500–700 нм), указывает на то, что все конъюгаты, в которых аминокислота остатка гомоцистеина заблокирована, обладают существенно меньшей способностью к образованию свободных радикалов по сравнению с *N*-гомоцистеинилированным HSA с той же степенью модификации (сравни Рис. 8, спектры *a*, *б*, *в* и *з*).



**Рис. 8.** Слева: электронные спектры поглощения реакционных смесей HSA и его конъюгатов при реакции с метилвиологеном. Справа: изменение цвета раствора в пробирках при реакции HSA и его конъюгатов с метилвиологеном. *a*) PFT-Hcy-HSA; *б*) TFA-Hcy-HSA; *в*) CH<sub>3</sub>C(O)-Hcy-HSA; *г*) Hcy-HSA; *д*) HSA; *е*) метилвиологен.

Концентрация белков 0,3 мМ, PBS pH 7,4.

На основании результатов, представленных в данном подразделе, можно сделать вывод, что блокирование аминокислотных остатков Hcy путем присоединения к ним фторорганических соединений, приводит к ингибированию образования гомоцистеинамида альбумина реакционноспособных свободных карборадикалов, а также снижает вероятность формирования модифицированными белками патогенных агрегатов, тем самым решается проблема токсичности молекулярного зонда, разрабатываемого на основе модифицированной формы альбумина.

Дополнительным подтверждением безопасности полученных конъюгатов альбумина являются данные цитотоксичности. Оценку жизнеспособности клеток производили колориметрическим методом с использованием МТТ<sup>1</sup> теста. Метод основан на том, что митохондриальные оксидоредуктазы живых клеток восстанавливают желтый МТТ до формазана. Количество образующегося формазана коррелирует с численностью жизнеспособных клеток в популяции. Растворы веществ в буфере PBS, для которых определялась цитотоксичность,

<sup>1</sup>Здесь и далее результаты МТТ теста получены совместно с сотрудником ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск) Захаровой О.Д.



Характеристики полученных конъюгатов альбумина приведены в табл. 2. В среднем каждая молекула белка содержит 3 остатка PFT(X)-Hcy. Методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (без добавления восстанавливающих агентов) было показано отсутствие образования высокомолекулярных агрегатов ( $MW > 130$  кДа), тогда как в образце флуоресцентно меченого *N*-гомоцистеинилированного HSA (Hcy-HSA-Cy5) их количество составляет ~ 70%.

Таблица 2

Структуры и характеристики полученных конъюгатов HSA, содержащих флуоресцентную и  $^{19}\text{F}$ -МРТ метки

аббревиатура	SH группы*	УФ-вид. $\lambda_{\text{max}}$ , нм ( $\epsilon$ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	$^{19}\text{F}$ -ЯМР (PBS, pH 7,4) $\delta$ , м.д.	M, кДа
PFT-Hcy-HSA-Cy5	$2,9 \pm 0,1$	652	109 ( $\text{CF}_3$ ), 17, 0	68,0
PFX-Hcy-HSA-Cy5	$3,1 \pm 0,1$	$((1,7 \pm 0,1) \times 10^5)$	109 ( $\text{CF}_3$ ), 47, 34, 4	68,2
PFT-Hcy-HSA-Cy7	$3,0 \pm 0,1$	762	109 ( $\text{CF}_3$ ), 17, 0	68,1
PFX-Hcy-HSA-Cy7	$3,0 \pm 0,1$	$((1,8 \pm 0,1) \times 10^5)$	109 ( $\text{CF}_3$ ), 47, 34, 4	68,3

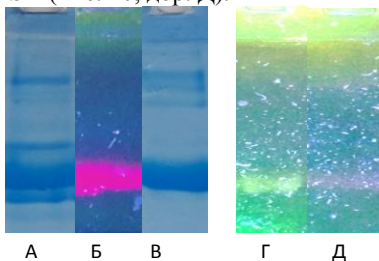
\*рассчитано на 1 молекулу белка

На следующем этапе работы, на примере конъюгата PFT-Hcy-HSA-Cy5, содержащем 3 остатка PFT-Hcy, были идентифицированы остатки лизина, которые при реакции *N*-гомоцистеинилирования подверглись модификации производным НТЛ, содержащим  $^{19}\text{F}$ -ЯМР метку. Определение точек модификации проводили согласно опубликованной методике (Sikora M. et al., 2010, 2014), которая была разработана для определения сайтов в *N*-гомоцистеинилированном HSA методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF). Было обнаружено, что ацилирование в альбумине происходит сайт-специфически по остаткам Lys-525, Lys-137 и Lys-205, при этом сайты совпадают с таковыми, характерными для природной модификации белка тиолактоном гомоцистеина *in vivo* или *in vitro*. Известно (Sikora M. et al., 2010), что *N*-гомоцистеинилирование HSA *in vivo* протекает преимущественно по остатку Lys-525 даже при очень низкой концентрации НТЛ в крови. При *N*-гомоцистеинилировании альбумина *in vivo* модифицируется также и остаток Lys-137 (Sikora M. et al., 2014; Marczak L. et al., 2011). Оба остатка (Lys-525 и Lys-137) вступали в реакцию с тиолактоном гомоцистеина и при проведении *N*-гомоцистеинилирования альбумина *in vitro* (Marczak L. et al., 2011; Sikora M. et al., 2010). В то же время, модификация по остатку Lys-205 протекает только в условиях *in vitro*. При *N*-гомоцистеинилировании альбумина *in vivo* модификации подвергался Lys-212 (Marczak L. et al., 2011). Различия в сайтах модификации *in vivo* (Lys-212) и *in vitro* (Lys-205), возможно, обусловлены образованием *in vivo* комплексов альбумина с эндогенными лигандами. В частности, показано, что изменение конформации белка за счет связывания с жирными кислотами приводит к существенному изменению в пространственной ориентации остатка Lys-205 (Huang B.X. et al., 2005). В конечном итоге это может привести к изменению предпочтительности разных остатков лизина для протекания реакции ацилирования с использованием НТЛ и его производных.

При получении бимодальных зондов по представленной выше схеме (Рис. 9) в настоящей работе использовался наиболее чистый препарат альбумина из коммерчески доступных (Sigma-Aldrich, A3782), свободный от глобулинов и жирных кислот. Известно, что даже наиболее чистый препарат альбумина, представляет собой смесь различных форм альбумина, среди которых присутствуют HSA, его димер, генетические варианты HSA (известно более 80), посттрансляционные модификации и т.д. Введение в организм человека конструкций медицинского назначения, полученных на основе такого альбумина, может быть не лишено побочных эффектов (нарушение коагуляции, гемолиз, депрессия миокарда, тошнота, озноб, лихорадка и др.) (Fanali G., 2012). Кроме того, из-за получения практически всех препаратов HSA путем фракционирования плазмы донорской крови, не исключена опасность контаминации инфекционными агентами, такими как вирус гепатита, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус. Мировая практика последних десятилетий демонстрирует отказ от препаратов, получаемых из крови, из-за значительного увеличения их себестоимости, вызванного необходимостью применения дорогостоящих тест-систем и использования глубокой очистки донорской крови и ее отдельных компонентов. Одним из возможных способов решения проблемы может быть использование рекомбинантного HSA, получаемого в клетках-продуцентах. Однако его рыночная стоимость по сравнению с HSA той же чистоты больше в 1,5-2 раза. По причине возможного присутствия антигенов к нему предъявляются существенно более высокие требования по чистоте, что увеличивает в разы его стоимость. Вышеизложенные проблемы можно решить путем использования для получения терапевтической конструкции альбумина конкретного индивида, для которого будет применяться препарат. Последний случай является фактически требованием новой прогрессивной парадигмы в медицине – персонализированной медицины: оказание комплексной медицинской помощи, осуществляемое в соответствии с характеристиками конкретного пациента. Все вышеизложенное указывает на актуальность разработки молекулярных зондов на основе собственных образцов крови пациента. В настоящей работе была исследована возможность введения флуорофора и  $^{19}\text{F}$  ЯМР метки в альбумин в составе белков плазмы крови.

На первом этапе исследования были подобраны условия для мечения альбумина в составе белков плазмы крови малеимидным производным флуоресцентного красителя Cy5 (1 экв., 3 ч, 37°C). Процесс контролировали методом гель-электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Как можно заметить, среди множества белковых зон (Рис. 10, дор. А) флуоресцирует только зона, которая по гель-электрофоретической подвижности соответствует HSA (Рис. 10, дор. Б). Селективность модификации только по остаткам Cys-34 альбумина обеспечивается, вероятно, высокой нуклеофильностью депротонированной сульфгидрильной группы. Известно (Peters Jr., 1996), что, несмотря на то, что константа ионизации сульфгидрильной группы остатков цистеина в белках  $\sim 8$ , значение  $pK_a$  остатка Cys-34 в альбумине составляет  $\sim 5$ . Без выделения белка, содержащего флуорофор, на следующей стадии проводили *N*-гомоцистеинилирование белков плазмы с помощью

фтормеченного производного тиолактона гомоцистеина (PFT-НТЛ) (3 экв., 16 ч, 37°C). Электрофоретическое разделение белков плазмы в SDS-PAGE с последующей элюцией белков из соответствующих белковых зон и их анализ методом  $^{19}\text{F}$ -ЯМР показали, что среди всех белков плазмы модификации преимущественно подвергается белок, содержащий флуоресцентный краситель (~ 85%). Данный белок по гель-электрофоретической подвижности соответствует HSA (Рис. 10, дор. Д).



**Рис. 10.** Электрофоретический анализ в условиях *Laemmli* (SDS-PAGE). Слева: модификация белков плазмы крови малеимидным производным Су5: плазма с малеимидным производным Су5 (дор. А, Б), контроль HSA (дор. В); дор. А, В - прокраска с помощью Кумасси синего. Справа: белки плазма крови после дальнейшего *N*-гомоцистеинилирования с помощью PFT-НТЛ; препарат реакционной смеси плазмы, инкубированный с *N*-(5-флуоресцеинил) малеимидом (дор. Г) и без него (дор. Д). Дор. Б, Г, Д флуоресцируют (фон пластины для тонкослойной хроматографии фирмы Merck (УФ 254 на алюминии) позволяет визуализировать краситель Су5). Усилена контрастность.

флуоресцеина, что подтверждает наличие в составе белка остатков гомоцистеина, содержащих  $^{19}\text{F}$  ЯМР метку.

Полученные результаты указывают на возможность введения флуорофора и  $^{19}\text{F}$  ЯМР метки в альбумин в составе белков плазмы крови. Получение бимодальных зондов путем модификации альбумина в составе белков плазмы конкретного человека и последующее введение полученного зонда в организм человека должны привести к существенно меньшим побочным эффектам, чем использование «чужеродного» белка, а также повысить безопасность процедуры (ввиду отсутствия чужеродных возбудителей заболеваний) и существенно уменьшить финансовые затраты на получение препарата (уменьшение количества стадий очистки).

Цитотоксичность молекулярных зондов PFT-Нсу-HSA-Су5 и PFX-Нсу-HSA-Су5, полученных на основе очищенного альбумина, оценивали с помощью МТТ-

Представленные результаты хорошо согласуются с тем фактом, что HSA является одной из основных мишеней *N*-гомоцистеинилирования белков в плазме крови (Jakubowski Н., 2007). Дополнительным подтверждением введения флуорофора и  $^{19}\text{F}$  ЯМР метки в HSA являются данные SDS-PAGE (Рис. 10, дор. Г и Д). При реакции *N*-гомоцистеинилирования белков происходит образование дополнительных SH групп, которые можно идентифицировать с помощью малеимидного производного флуоресцеина. Добавление этого реагента в пробу, перед нанесением её на гель, должно привести к мечению флуоресцентным красителем белков, содержащих SH группы. Как можно заметить из рис. 10, при сравнении с контролем (Рис. 10, дор. Д), белковые зоны в полосе, соответствующей по гель-электрофоретической подвижности HSA (Рис. 10, дор. Г), флуоресцируют светом, характерным для красителя



теста. Растворы белковых препаратов (HSA-Cy5, PFT-Hcy-HSA-Cy5 и PFX-Hcy-HSA-Cy5) инкубировали в буфере PBS с клетками миеломы человека RPMI 8226 в течение 72 ч, дальнейшее определение проводили колориметрическим методом с использованием МТТ теста. Было выявлено, что конъюгаты альбумина, содержащие флуорофор и магнитно-резонансные метки, существенно не влияют на жизнеспособность опухолевых клеток. При этом конъюгаты с высокой эффективностью связываются клетками. Для количественной оценки связывания бимодального зонда с клетками RPMI 8226 использовали метод проточной цитофлуориметрии.<sup>2</sup> В качестве контроля использовали HSA-Cy5 и интактные клетки. Показано, что фтормеченный альбумин (PFT-Hcy-HSA-Cy5) обладает почти такой же эффективностью связывания клетками (~ 80%), что и HSA-Cy5 (~ 82%).

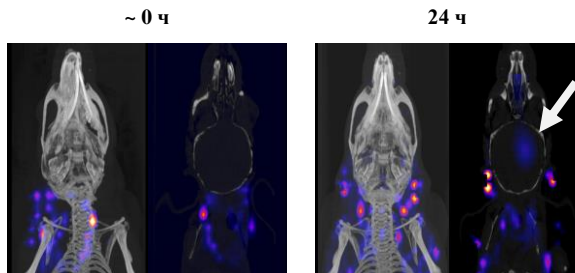
В настоящей работе в качестве *in vivo* модели для проверки возможности использования разработанных на основе альбумина бимодальных зондов для визуализации опухоли головного мозга методами <sup>19</sup>F-MPT и оптической томографии (FLECT/CT) была использована модель ортотопической ксенотрансплантации клеток глиобластомы человека U87 иммунодефицитным животным SCID. Выбор в качестве модели данного типа опухоли обусловлен тем, что глиобластомы – нейроэктодермальные опухоли головного мозга человека, занимают лидирующее место в структуре нейроонкологических заболеваний. Данный тип новообразования крайне «агрессивен», что значительно усложняет процесс терапии, и средняя продолжительность жизни больных глиобластомой не превышает 9–12 мес. Высокая социальная значимость этого заболевания требует создания чувствительных методов визуализации опухоли в мозгу. Для интраоперационных исследований в настоящее время разрабатывается новое направление в хирургии головного мозга, основанное на использовании молекулярных зондов, снабженных флуоресцентной меткой. Такие зонды позволяют лучше определить границы опухоли, что необходимо при хирургическом удалении опухолей головного мозга для обеспечения максимального терапевтического успеха и минимизации сопутствующего ущерба. На основе HSA уже был разработан конъюгат альбумина с флуоресцеином. На текущий момент препарат находится на II этапе медицинских испытаний. Несмотря на безусловные хорошие достигнутые результаты с красителем флуоресцеином, к настоящему моменту предполагают использовать красители ближнего ИК-диапазона (700–900 нм) для нивелирования автофлуоресценции и улучшения диагностики ввиду большей проникающей способности излучения. В настоящей работе были синтезированы конъюгаты альбумина PFT-Hcy-HSA-Cy7, содержащие флуоресцентный краситель Cy7, который в составе конъюгата имеет максимум поглощения на длине волны 762 нм. Поскольку разработанные на основе альбумина бимодальные зонды содержат флуоресцентную метку, использование гибридной система 3D оптической визуализации и компьютерной томографии (InSyTe™ FLECT/CT) позволило без

---

<sup>2</sup>Результаты проточной цитофлуориметрии получены совместно с сотрудниками ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск) Коваль О.А. и Захаровой О.Д.

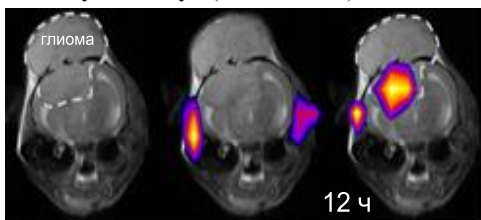
нанесения вреда экспериментальным животным получить два изображения, путем наложения которых удалось четко локализовать молекулярный зонд в организме.

Подкожное введение зонда PFT-Hcy-HSA-Cy7 экспериментальным животным, инфильтрированным глиобластомой U87 человека, и последующая прижизненная молекулярная флуоресцентная визуализация с привлечением метода FLECT/CT демонстрируют постепенное распространение исследуемого образца со временем и накопление его в опухоли (Рис. 11).

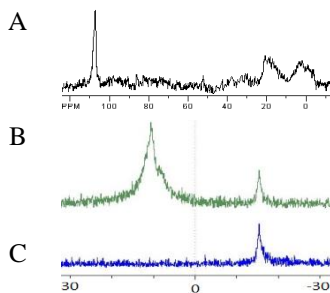


**Рис. 11.** Изменение распространения флуоресцентного сигнала от PFT-Hcy-HSA-Cy7 при подкожном введении, полученного с помощью комбинации компьютерной и оптической томографии (FLECT/CT) сразу после введения и через 24 ч.<sup>3</sup> Визуализируемый очаг (глиома) отмечен стрелочкой.

В экспериментах на мышах с опухолью головного мозга, в настоящей работе в качестве контрастного агента использовался бимодальный зонд PFT-Hcy-HSA-Cy5 (Рис. 12 и 13).



**Рис. 13.** *In vivo* МРТ-визуализация опухоли U87 и накопления в ней зонда PFT-Hcy-HSA-Cy5 при подкожной инъекции в области шеи. Слева –  $^1\text{H}$ -МРТ до инъекции; в центре – наложение  $^{19}\text{F}/^1\text{H}$  томограмм сразу после подкожной инъекции зонда в область шеи; справа – наложение  $^{19}\text{F}/^1\text{H}$  томограмм спустя 12 ч после инъекции. Белым пунктиром обозначены границы опухоли.



**Рис. 12.**  $^{19}\text{F}$  ЯМР спектры PFT-HSA-Cy5 (1 mM) (A, B). А - на спектрометре AV-300; В - на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR. Сигнал от катушки на томографе без образца (С).

<sup>3</sup>Здесь и далее результаты МРТ и FLECT/CT были получены сотрудниками ИЦИГ СО РАН (г. Новосибирск) на базе ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных (SPF-виварий)» Акуловым А.Е. и Шевелевым О.Б.

Выбор метода  $^{19}\text{F}$  МРТ для визуализации опухоли с использованием молекулярных зондов, содержащих магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ), обусловлен оптимальным соотношением сигнала и шума за счет крайне низкого содержания фтора в живых организмах, а также из-за высокой чувствительности МРТ на ядрах фтора ( $^{19}\text{F}$ ), сравнимой с  $^1\text{H}$ -МРТ. Физиологическая концентрация обнаруживаемого эндогенного фтора в организме человека ниже предела чувствительности метода, так что экзогенное фторсодержащее соединение может легко детектироваться.

В спектре  $^{19}\text{F}$  ЯМР этого конъюгата (Рис. 12 А) регистрируются несколько сигналов фторов, однако для исследований методом  $^{19}\text{F}$ -МРТ оптимальным является сигнал  $\text{CF}_3$  группы остатка перфтортолуола, как наиболее интенсивный и узкий сигнал, не пересекающийся с сигналом катушки на томографе (Рис. 12 В и С). На рис. 13 представлены результаты эксперимента с использованием метода  $^{19}\text{F}$  МРТ, из которых видно, что через 12 ч после подкожной инъекции в область шеи молекулярного зонда PFT-Hcy-HSA-Cy5, происходит накопление модифицированного альбумина в опухоли головного мозга. Положение зонда детектируется как «горячее пятно на холодном фоне». Комбинация  $^1\text{H}$ - и  $^{19}\text{F}$ -изображений в МРТ позволяет получать точную трехмерную картину опухоли и место локализации молекулярного зонда. Полученные результаты демонстрируют, что декорированный  $^{19}\text{F}$ -ЯМР метками HSA обладает значительным потенциалом молекулярного зонда для исследований *in vivo* с применением метода  $^{19}\text{F}$  МРТ. Подкожное введение по результатам компьютерной и оптической томографии, а также  $^{19}\text{F}$  МРТ демонстрируют возможность обнаружения бимодальных зондов в опухоли при их достаточной концентрации.

Таким образом, в рамках настоящей работы были получены конъюгаты альбумина, содержащие флуоресцентную метку и магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ), которые могут быть использованы в качестве бимодальных зондов для визуализации опухоли головного мозга методами  $^{19}\text{F}$  МРТ и оптической томографии.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан новый подход к декорированию человеческого сывороточного альбумина магнитно-резонансными метками (ядра  $^{19}\text{F}$ ). Подход основан на посттрансляционной модификации белка – *N*-гомоцистеинилировании альбумина, с использованием в качестве ацилирующих реагентов впервые синтезированных производных тиолактона гомоцистеина, содержащих различные типы фторорганических соединений, введенных по аминогруппе тиолактона.
2. Показано, что использование *N*-фтормеченных аналогов природного модификатора тиолактона гомоцистеина обеспечивает возможность сайт-специфически вводить  $^{19}\text{F}$  ЯМР метки как в очищенный альбумин, так и селективно модифицировать альбумин в составе белков плазмы крови.
3. Установлено, что блокирование аминогрупп остатков гомоцистеина (путем присоединения фторорганических соединений) приводит к ингибированию образования гомоцистеинамидами альбумина реакционноспособных карборадикалов, и снижает вероятность образования токсичных высокомолекулярных агрегатов.
4. Разработан подход к получению бимодального зонда на основе человеческого сывороточного альбумина основанный на селективной модификации остатка Cys-34 малеимидными производными флуоресцентных красителей (Cy5 или Cy7), и последующего *N*-гомоцистеинилирования белка с участием производных тиолактона гомоцистеина, содержащих различные типы фторорганических соединений, введенных по аминогруппе тиолактона. Продемонстрированы: а) биосовместимость бимодальных молекулярных зондов (МТТ-тест); б) возможность прижизненной мультимодальной молекулярной визуализации экспериментальной глиомы методами  $^{19}\text{F}$  МРТ и флуоресцентной томографии (FLECT/CT).

**Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. **Chubarov A. S.**, Zakharova O. D., Koval O. A., Romaschenko A. V., Akulov A. E., Zavjalov E. L., Razumov I. A., Koptyug I. V., Knorre D. G., Godovikova T. S. Design of protein homocystamides with enhanced tumor uptake properties for  $^{19}\text{F}$  magnetic resonance imaging // *Bioorg. Med. Chem.* –2015. –V. 23. –P. 6943–6954.
2. **Chubarov A. S.**, Shakirov M. M., Koptyug I. V., Sagdeev R. Z., Knorre D. G., Godovikova T. S. Synthesis and characterization of fluorinated homocysteine derivatives as potential molecular probes for  $^{19}\text{F}$  magnetic resonance spectroscopy and imaging // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* –2011. –V. 21. –P. 4050–4053.
3. **Чубаров А. С.**, Годовикова Т. С., Сильников В. Н., Платонов В. Е. Контрастирующий агент для введения фтор-19 метки в белки, содержащие остатки лизина. Патент РФ № 2599500. Приоритет от 04.08.2015. Опубл. 10.10.2016. Бюл. № 28.
4. **Чубаров А. С.**, Годовикова Т. С., Ahmad S., Сильников В. Н. Визуализирующие системы на основе человеческого сывороточного альбумина для МРТ диагностики патологических процессов // *Хим. Инт. Уст. Разв.* –2016. –Т. 24. –С. 585–595.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программе «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (RFMEFI61314X0015), междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 60, грантов РФФИ 11-04-01377-а и 14-04-00531а, гранта научной школы НШ-105.2014.4.