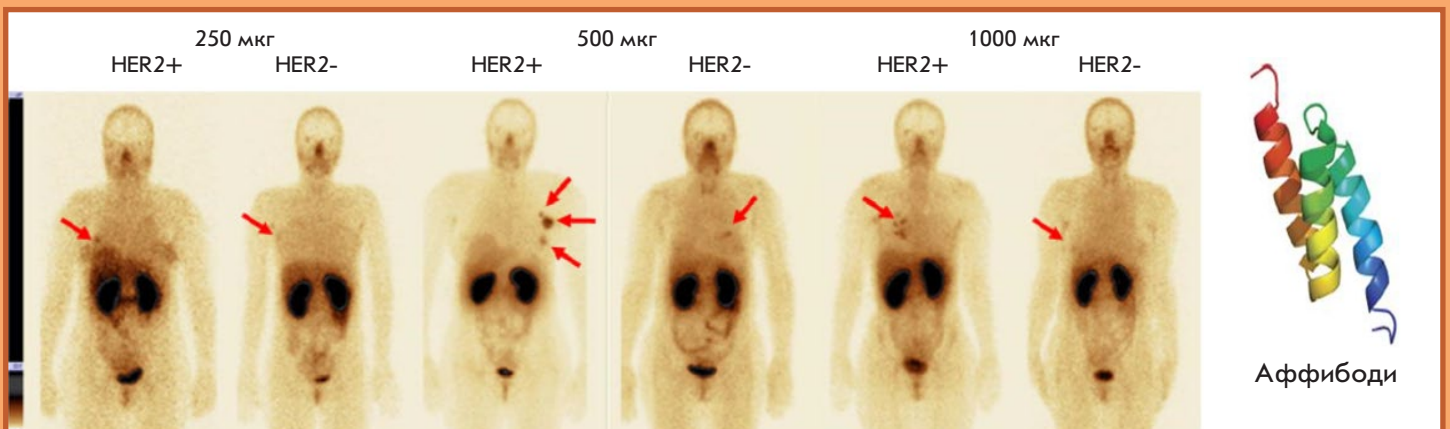
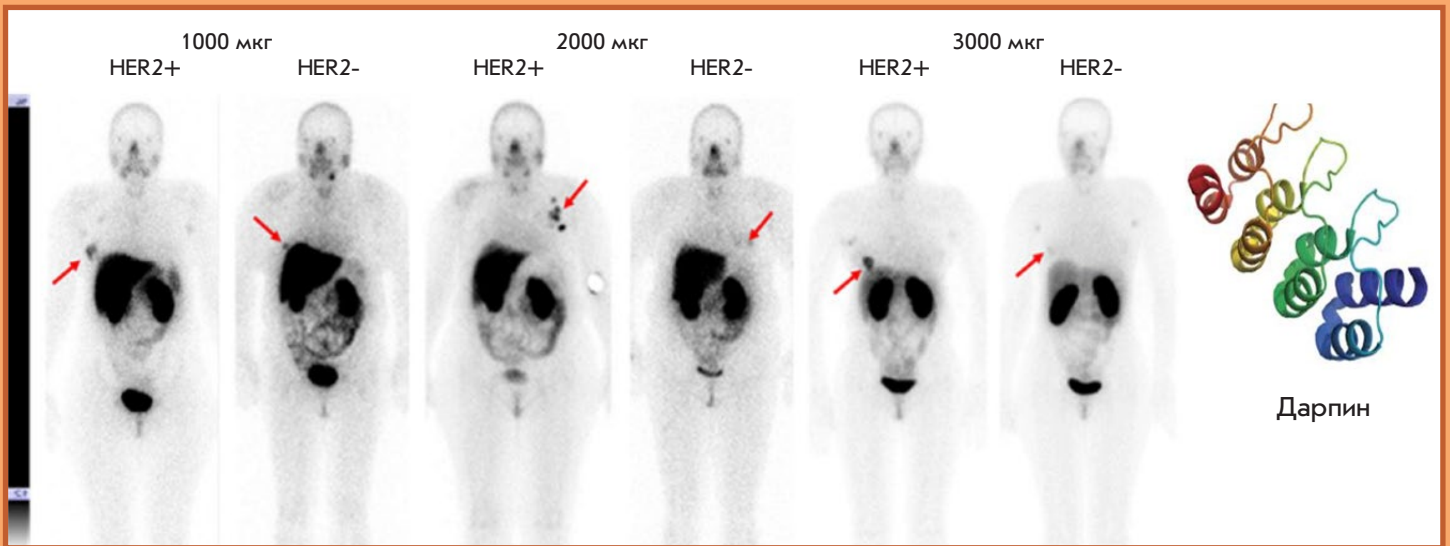


# Acta Naturae

## Эволюция таргетной радионуклидной диагностики рака



СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ  
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ  
ВИРУСОМ ОСПОВАКЦИНЫ  
СТР. 62

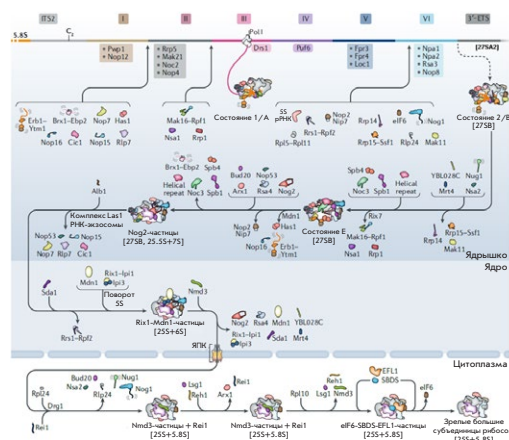
АНТИТЕЛА ПРОТИВ НЕОБЫЧНЫХ  
ФОРМ СИАЛИЛИРОВАННЫХ  
ГЛИКАНОВ  
СТР. 85

## Биогенез рибосом эукариот: 60S субъединица

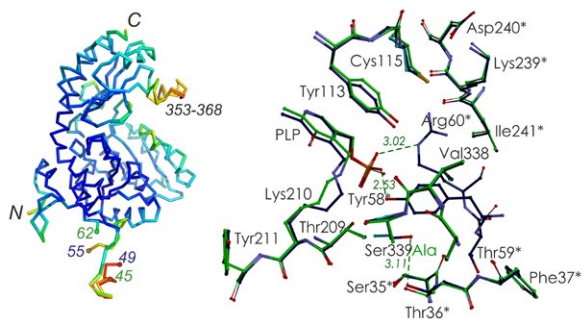
А. А. Моралева, А. С. Дерябин, Ю. П. Рубцов, М. П. Рубцова, О. А. Донцова

Биогенез рибосом – последовательное скоординированное созревание рибосомных предшественников в ядрышке, нуклеоплазме и цитоплазме. Основные особенности и стадии биогенеза рибосом одинаковы в разных группах эукариот, однако в клетках человека этот процесс претерпел усложнение из-за увеличения размера рибосом и прерибосом, а также усложнения регуляторных путей, влияющих на их сборку и функцию.

Схема сборки большой субъединицы дрожжей



## *Citrobacter freundii* метионин— $\gamma$ -лиаза: роль серина 339 в катализе реакций $\gamma$ - и $\beta$ -элиминирования



Наложение структур *C. freundii* МГЛ дикого типа и Ser339Ala МГЛ

Н. В. Ануфриева, Е. А. Морозова, С. В. Ревтович, Н. П. Бажулина, В. П. Тимофеев, Я. В. Ткачев, Н. Г. Фалеев, А. Д. Никулин, Т. В. Демидкина

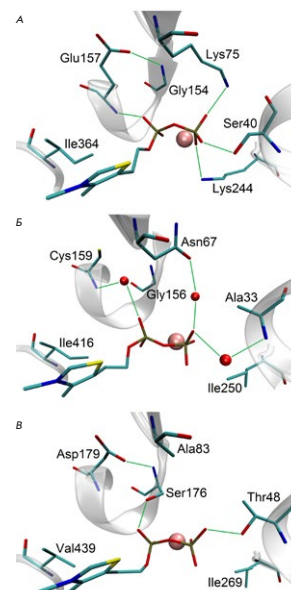
Анализ кинетических, спектральных данных и известных пространственных структур *Citrobacter freundii* МГЛ свидетельствует, что остаток серина 339 необходим для эффективного катализа реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования на стадии отрыва C- $\alpha$ -протона внешнего альдимины и в реакции  $\gamma$ -элиминирования на стадиях протонирования C4'-атома кофермента и отрыва C- $\beta$ -протона в кетиминном интермедиате.

## Выделение и биохимическая характеристика рекомбинантной транскетолазы *Mycobacterium tuberculosis*

Т. А. Щербакова, С. М. Балдин, М. С. Шумков, И. В. Гущина, Д. К. Нилов, В. К. Швядас

С использованием плазмиды pET-19b, несущей ген *Rv1449c*, получены препараты холо- и апоформ микобактериальной транскетолазы mbTK, проведены выделение и очистка рекомбинантного фермента. Показано, что микобактериальная транскетолаза mbTK по своим биохимическим свойствам существенно отличается как от гомологичного фермента человека hTK, так и от дрожжевого фермента yTK, что связано с заменой остатков лизина в активном центре на менее полярные аминокислотные остатки.

Взаимодействия кофактора ТДФ с переменными остатками в активном центре гомологичных ферментов hTK (А), yTK (Б) и mbTK (В)



## Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,  
Национальный исследовательский университет  
«Высшая школа экономики»

## Редакционный совет:

Председатель: А.И. Григорьев  
Главные редакторы: А.Г. Габиров, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,  
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,  
М.В. Угрюмов

## Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),  
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),  
И.П. Биленкина (Москва, Россия),  
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),  
Дж. Ву (Шанхай, Китай),  
В.М. Говорун (Москва, Россия),  
С.М. Деев (Москва, Россия),  
О.А. Донцова (Москва, Россия),  
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),  
М. Зуали (Париж, Франция),  
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),  
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),  
П. Массон (Гренобль, Франция),  
В.О. Попов (Москва, Россия),  
И.А. Тихонович (Москва, Россия),  
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),  
А. Фрибуле (Компьень, Франция),  
В.К. Швядас (Москва, Россия),  
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин

Верстка: К.К. Опарин

Корректура: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

WEB-редактор: О.Б. Семина

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60

E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал  
*Acta Naturae* обязательна. Любое воспроизведение опубликованных  
материалов без письменного согласия редакции не допускается.  
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,  
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2022

Номер подписан в печать 29 июня 2022 г.

Тираж 25 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,  
г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2

Включен в базы данных PubMed,  
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал *Acta Naturae* входит  
в Перечень ведущих периодических  
изданий Высшей аттестационной комиссии  
Минобрнауки России

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.204

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

О. Д. Брагина, С. М. Деев, В. И. Чернов,  
В. М. Толмачев

Эволюция таргетной радионуклидной  
диагностики HER2-позитивного рака  
молочной железы ..... 4

И. Д. Константинова, В. Л. Андропова,  
И. В. Фатеев, Р. С. Есипов

Фавипиравир и его структурные аналоги:  
антивирусная активность,  
способы синтеза ..... 16

А. А. Моралева, А. С. Дерябин,  
Ю. П. Рубцов, М. П. Рубцова, О. А. Донцова  
Биогенез рибосом эукариот:  
60S субъединица ..... 39

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Н. В. Ануфриева, Е. А. Морозова,  
С. В. Ревтович, Н. П. Бажулина,  
В. П. Тимофеев, Я. В. Ткачев, Н. Г. Фалеев,  
А. Д. Никулин, Т. В. Демидкина  
*Citrobacter freundii* метионин- $\gamma$ -лиаза:  
роль серина 339 в катализе реакций  
 $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования ..... 50

Н. С. Васильева, А. Б. Агеенко,  
В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина  
Сигнальные пути, определяющие  
эффективность терапии глиобластомы  
вирусом осповакцины ..... 62

Д. А. Лукьянов, В. С. Буев,  
Я. А. Иваненков, В. Г. Карцев,  
Д. А. Скворцов, И. А. Остерман,  
П. В. Сергиев  
Новый ингибитор трансляции —  
производное имидазола ..... 71

А. В. Моршнева, О. О. Гнедина,  
Д. Н. Киндт, М. В. Иготти  
Ras участвует в регуляции  
стабильности аденовирусного белка  
E1A через MAP-киназу ERK ..... 78

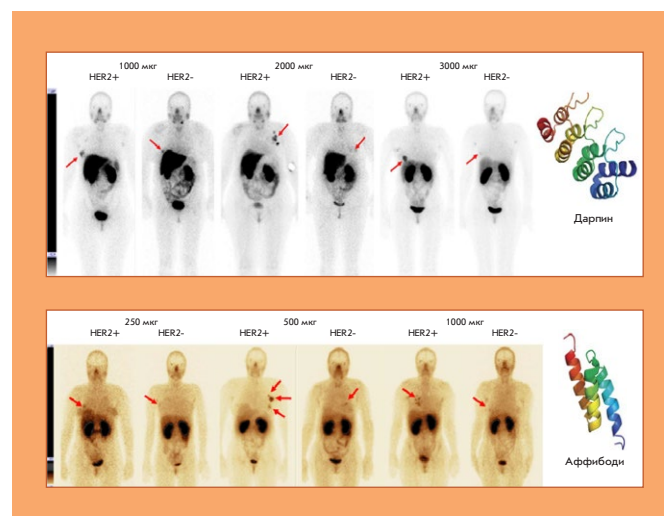
П. С. Обухова, М. М. Зиганшина,  
Н. В. Шилова, А. А. Чинарев, Г. В. Пазынина,  
А. Ю. Нокель, А. В. Терентьева,  
Н. Р. Хасбиуллина, Г. Т. Сухих, А. А. Рагимов,  
Э. Л. Салимов, В. И. Бутвиловская,  
С. М. Полякова, Д. Саха, Н. В. Бовин  
Антитела против необычных форм  
сиалилированных гликанов ..... 85

Т. А. Щербакова, С. М. Балдин,  
М. С. Шумков, И. В. Гущина, Д. К. Нилов,  
В. К. Швядас  
Выделение и биохимическая характеристика  
рекомбинантной транскетолазы  
*Mycobacterium tuberculosis* ..... 93

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

С. В. Тиллиб, О. С. Горяйнова, А. М. Сачко,  
Т. И. Иванова  
Высокоаффинные однодоменные  
антитела для анализа апо-  
и голотрансферрина человека ..... 98

Правила для авторов ..... 103



**РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ**  
(см. статью Брагиной и др.)



УДК 618.29-006.6-073.916

# Эволюция таргетной радионуклидной диагностики HER2-позитивного рака молочной железы

О. Д. Брагина<sup>1,2</sup>, С. М. Деев<sup>2,3</sup>, В. И. Чернов<sup>1,2</sup>, В. М. Толмачев<sup>2,4</sup><sup>1</sup>Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, 634009 Россия<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, 634050 Россия<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия<sup>4</sup>Упсальский университет, Упсала, Швеция

\*E-mail: rungis@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.2021

Принята к печати 18.03.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11611

**РЕФЕРАТ** Представленный обзор посвящен «клинической» эволюции радионуклидной диагностики HER2-позитивного рака молочной железы с использованием в качестве «нацеливающего» модуля различных структур – от «полноразмерных» антител до новой группы синтетических белков небольшого размера – альтернативных каркасных белков. Эта тематика особенно актуальна в связи с существующими проблемами выявления злокачественных опухолей молочной железы с гиперэкспрессией HER2/неу, что во многих случаях ведет к назначению неадекватного системного лечения у пациентов этой категории. Результаты клинических исследований радиофармпрепаратов на основе молекул аффибоды, адаптов и дарпинов для ОФЭКТ и ПЭТ продемонстрировали их хорошую переносимость, быстрое выведение из организма и возможность дифференцировки опухолевых очагов в зависимости от статуса рецептора эпидермального фактора роста HER2/неу, что свидетельствует о перспективности таргетной радионуклидной диагностики и необходимости продолжения исследований в данном направлении.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рак молочной железы, HER2/неу, радионуклидная диагностика, моноклональное антитело, альтернативные каркасные белки.

## ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно в мире диагностируется более 10 млн новых случаев злокачественных образований, при этом около 7.6 млн человек умирают от данной патологии [1]. На этом фоне в структуре онкологических заболеваний среди женского населения лидирующие позиции по показателям заболеваемости и смертности уверенно занимает рак молочной железы (РМЖ) [2]. Так, по данным ESMO (European Society for Medical Oncology) Guidelines, в 2018 году во всем мире насчитывалось около 2.1 млн новых случаев РМЖ (почти каждый четвертый случай), при этом 630 000 больных умерли от данной патологии [3]. На территории Российской Федерации в 2019 году зарегистрировано 70682 случая РМЖ (20.9% в структуре онкологических заболеваний женского населения); показатель смертности при этом составил 1.6% [4]. В структуре смертности женского населения РМЖ также находится на первом месте – 16.2% [5].

Несмотря на широкую распространенность РМЖ, начиная с 2012 года увеличивается продолжитель-

ность жизни больных, которым диагноз РМЖ был поставлен в течение последних 5 лет и более (пациентки с признаками или без признаков болезни). Так, в Российской Федерации этот показатель составляет 59.8% [6]. Подобные результаты прежде всего обусловлены улучшением диагностических алгоритмов и совершенствованием как локального, так и системного лечения [7]. В частности, в последнее время в терапии онкологических заболеваний широко используется концепция персонифицированной медицины, подразумевающая назначение лечения согласно индивидуальным характеристикам каждого пациента и учет предполагаемого ответа на него [8]. В настоящее время в онкологической практике широко применяется концепция персонифицированной медицины. К одному из наиболее стремительно развивающихся направлений персонифицированной медицины относится тераностика, которая объединяет понятия «терапия» и «диагностика» и подразумевает использование агентов или методов, включающих диагностическую визуализацию и таргетную терапию [9]. При этом «ви-

зуализирующий» этап тераностического подхода состоит из обработки изображений, визуализации биологической мишени и идентификации подгруппы пациентов, у которых ожидается наибольшая эффективность планируемого лечения; последующий же «терапевтический» этап представляет собой введение лекарственного агента, воздействующего на выявленные ранее мишени [10]. Основными целями данной стратегии являются повышение эффективности проводимой терапии, улучшение показателей выживаемости онкологических больных, снижение побочных реакций и вытекающее из этого уменьшение общих затрат [11]. Стремительный прогресс в развитии тераностического подхода во многом обусловлен получением новых данных о молекулярных основах канцерогенеза, созданием технологий изготовления новых биологических агентов, а также улучшением качества и точности диагностических приборов [12].

### РЕЦЕПТОР ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА HER2/neu

Одной из наиболее изученных молекулярных мишеней, локализованных на поверхности опухолевых клеток, является рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER2/neu), относящийся к семейству трансмембранных рецепторов тирозинкиназ EGF (рецептор эпидермального фактора роста: ErbB1/HER1; ErbB2/HER2; ErbB3/HER3; ErbB4/HER4) и регулирующий процессы клеточного деления, роста, дифференцировки, пролиферации, миграции и апоптоза [13, 14]. Гиперэкспрессия HER2/neu, выявляемая при раке желудка, яичников, простаты, легких, мочевого пузыря и др., наиболее часто встречается при инвазивном раке молочной железы [15, 16]. В большинстве случаев повышенная экспрессия HER2/neu в опухолевой клетке обусловлена амплификацией гена *ERBB2*, расположенного в локусе 17q12 хромосомы, и сопряжена со специфическими изменениями в некоторых локусах других хромосом (11q13, 16q22–q24 и 18q21) [17].

Гиперэкспрессия HER2/neu и/или амплификация гена *ERBB2* встречается в 15–20% случаев РМЖ и считается неблагоприятным прогностическим фактором, она проявляется агрессивным течением заболевания, а также низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости [18, 19]. Согласно российским и международным клиническим рекомендациям, в случае опухолей, характеризующихся высокой экспрессией данного рецептора, требуется назначение направленного (таргетного) лечения с использованием препаратов, применяемых как в монорежиме, так и в комбинации с химиотерапией [20]. «Золотым» стандартом лечения

HER2-позитивного рака молочной железы остается таргетный препарат герцептин, содержащий гуманизированное моноклональное антитело (мкАТ) трастузумаб, – первое одобренное FDA (Food and Drug Administration, США) в 1998 году соединение для подавления функции HER2/neu. Использование трастузумаба в терапии метастатического рака молочной железы в сочетании с таксанами привело к увеличению частоты ответа, показателей выживаемости без прогрессирования (ВБП) и общей выживаемости (ОВ) [21]. Для проведения таргетной терапии требуется тщательный отбор кандидатов [22]. В настоящее время для определения статуса HER2/neu разработаны несколько методик, оценивающих экспрессию маркера на уровне белка, ДНК и РНК. Наибольшее распространение среди них получили одобренные FDA иммуногистохимическое исследование (ИГХ) и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) [23].

Иммуногистохимическое исследование представляет собой широко используемый метод оценки экспрессии HER2/neu на поверхности опухолевых клеток в фиксированных формалином образцах рака молочной железы [24]. Согласно рекомендациям Американского общества клинической онкологии (ASCO) от 2018 года, негативными считаются случаи категории 0 и 1+, положительными – категории «3+». Таргетная терапия назначается больным, у которых гиперэкспрессия рецептора соответствует оценке «3+». Случаи «2+» относятся к «сомнительным» и требуют проведения флуоресцентной (FISH) гибридизации *in situ* для определения амплификации гена *ERBB2* [25].

Несмотря на доступность и относительно низкую стоимость исследования, на результаты ИГХ могут значительно влиять многочисленные факторы, такие, как методика приготовления препарата (продолжительность фиксации и используемый фиксатор), характеристика используемых антител (производитель), квалификация персонала и интерпретация полученных результатов, преимущественно случаев с оценкой 2+ [26].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) – цитогенетический метод, в котором используют флуоресцентно меченные зонды для обнаружения специфических последовательностей ДНК в фиксированных формалином образцах ткани рака молочной железы. В образцах рака молочной железы FISH применяют для количественного определения числа копий гена *ERBB2* в ядрах опухолевых клеток; амплификация считается положительной при наличии среднего количества копий гена *ERBB2* и среднем числе центромер хромосомы 17 в клетке более 2.2. Несомненными преимуще-

ществами флуоресцентной гибридизации *in situ* являются более объективные и количественные результаты по сравнению с ИГХ, что, вероятно, обусловлено большей стабильностью ДНК и наличием внутренних контролей, состоящих из неамплифицированных сигналов в неопухолевых клетках (эпителиальные клетки протоков и стромальные клетки), прилегающих к опухоли [27].

FISH – это очень надежный метод оценки амплификации гена *ERBB2*, однако на его выполнение требуется в 9 раз больше времени (36 ч против 4 ч), его стоимость в несколько раз выше, чем у стандартного иммуногистохимического анализа, для обнаружения и распознавания сигналов необходимо дорогое оборудование, а также высококвалифицированный персонал для обработки полученных результатов [28].

С клинической точки зрения существенным недостатком «традиционных» методов определения статуса HER2/neu на диагностическом этапе является невозможность одномоментной оценки распространенности опухолевого процесса *in vivo* с анализом молекулярных характеристик выявленных опухолевых очагов до назначения специального лечения [29]. Этот факт имеет особое значение в аспекте все чаще обсуждаемой гетерогенности экспрессии HER2/neu в первичной опухоли, регионарных и отдаленных метастатических очагах, что может встречаться, согласно данным различных анализов, в 6–48% случаев [30]. Практически в 20% случаев рака молочной железы выявлено несоответствие статуса HER2/neu в первичной опухоли и пораженных лимфатических узлах [31]. В случае метастатических очагов в удаленных органах и тканях такое несоответствие составило, согласно Lower и соавт., 14,3%, тогда как по данным Turner и соавт. этот показатель достигал 34% [32, 33]. Наиболее существенное значение этот факт имеет при метастатическом раке молочной железы, который характеризуется длительным и «волнообразным» течением, что требует нескольких этапов и видов системного лечения. Выполнение же биопсии или хирургического забора материала из существующих и/или вновь выявленных метастатических очагов для оптимизации тактики лечения порой технически невыполнимо либо может повлечь за собой серьезные осложнения [30].

Нерешенной остается и проблема внутриопухолевой гетерогенности, которая встречается в 40% случаев рака молочной железы и может быть представлена сосуществованием множества субпопуляций клеток с различной экспрессией HER2/neu в одной и той же опухоли [34, 35]. Недавние исследования показали, что у больных с HER2-положительным РМЖ с внутриопухолевой гетерогенно-

стью экспрессии рецептора показатель безрецидивной выживаемости (БРВ), а также эффективность таргетной терапии трастузумабом снижены по сравнению с опухолями с гомогенной экспрессией [36]. Несмотря на это, пока не изучена связь между гетерогенностью HER2 и отдаленными результатами лечения больных после хирургического вмешательства. Все это обуславливает необходимость разработки новых дополнительных диагностических методик для оптимизации процесса диагностики у больных раком молочной железы [37].

### РАДИОНУКЛИДНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ HER2-ПОЗИТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В последние годы изучаются возможности выявления злокачественных новообразований с помощью таргетных радионуклидных методов [38]. Одним из наиболее изучаемых подходов к связыванию с рецептором HER2/neu является использование меченых моноклональных антител (мкАТ) [39]. Диагностические радиофармпрепараты (РФП), применяемые в онкологической практике, относятся к содержащим радионуклиды препаратам для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) ( $\gamma$ -излучатели с энергией в пределах 100–200 кэВ и периодами полураспада от нескольких минут до нескольких суток) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) ( $\beta^+$ -излучатели с периодами полураспада от нескольких секунд до нескольких часов) [40]. Сравнительная характеристика радиоизотопов, используемых для радионуклидной визуализации, представлена в *табл. 1*.

ОФЭКТ получила широкое распространение во многом благодаря своей низкой себестоимости, в то время как ПЭТ-диагностика, имеющая более высокую стоимость, обеспечивает значительно лучшую чувствительность, пространственное разрешение и точность количественного определения. Недавнее внедрение сканеров для ОФЭКТ-диагностики на основе теллурида кадмия и цинка позволяет значительно увеличить чувствительность и разрешение камеры [41, 42].

По сравнению с «инвазивными» методами диагностики радионуклидная визуализация онкологических заболеваний со сверхэкспрессией HER2/neu имеет ряд существенных преимуществ, к которым относятся неинвазивный характер исследования с возможностью проведения повторных исследований [43], оценка экспрессии маркера в динамике на фоне проводимого лечения; одномоментная визуализация всего тела больного с оценкой экспрессии рецептора HER/neu в первичной опухоли и метастатических очагах, а также совершенствование диагностического оборудования, проявляю-

щееся в разработке аппаратов, сочетающих модули для радионуклидных исследований и модули для анатомической визуализации метастатических очагов (компьютерная томография и магнитно-резонансная томография) [44].

В настоящее время известны несколько классов «нацеливающих» модулей, потенциально применимых для радионуклидной визуализации рецепторов HER2/neu: моноклональные антитела; фрагменты антител (Fab- и Fab<sub>2</sub>-фрагменты, диабоды, минибоды, одноцепочечные переменные фрагменты scFv и на-

нободы); аптамеры нуклеиновых кислот; рационально сконструированные короткие пептиды и альтернативные каркасные белки (скаффолды), выбранные при помощи молекулярного дисплея (табл. 2) [45, 46].

### Радионуклидная диагностика HER2-позитивного рака молочной железы с использованием полноразмерных антител

Первыми «нацеливающими» модулями для диагностики экспрессии рецептора эпидермального фактора роста типа 2 стали меченные различными радиоизотопами полноразмерные моноклональные антитела [47]. Высокоспецифичное взаимодействие мкАТ с соответствующим антигеном стало отправной точкой для проведения доклинических и клинических исследований, направленных на изучение возможности использования антител в качестве «транспорта» для доставки радионуклидов к опухолевым клеткам, их визуализации или оказания на них радиационного цитотоксического воздействия. Длительная циркуляция мкАТ в организме больного требовала использования долгоживущих позитронных эмиттеров, таких, как <sup>89</sup>Zr (цирконий-89), <sup>64</sup>Cu (медь-64), <sup>124</sup>I (йод-124) и <sup>86</sup>Y (иттрий-86) [48].

С момента создания трастузумаба в качестве средства для лечения больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu меченные различными радиоизотопами молекулы препарата начали активно использовать для изучения диагностической эффективности выявления экспрессии рецептора эпидермального фактора роста типа 2 [49]. Первым меченым моноклональным антителом, прошедшим клиническую апробацию у пациенток с HER2-позитивным раком молочной железы, был

**Таблица 1.** Радиоизотопы для проведения радионуклидной диагностики с использованием ПЭТ или ОФЭКТ

Радиоизотопы	Период полураспада, T <sub>1/2</sub>	Способ получения
Радиоизотопы для ОФЭКТ		
<sup>99m</sup> Tc	6.01 ч	Генератор
<sup>123</sup> I	13.3 ч	Циклотрон
<sup>111</sup> In	2.8 дня	Циклотрон
Радиоизотопы для ПЭТ		
<sup>15</sup> O	2.03 мин	Циклотрон
<sup>13</sup> N	9.97 мин	Циклотрон
<sup>11</sup> C	20.4 мин	Циклотрон
<sup>68</sup> Ga	67.7 мин	Генератор
<sup>18</sup> F	109.8 мин	Циклотрон
<sup>64</sup> Cu	12.7 ч	Циклотрон
<sup>76</sup> Br	16.2 ч	Циклотрон
<sup>89</sup> Zr	78.4 ч	Циклотрон
<sup>124</sup> I	100 ч	Циклотрон

**Таблица 2.** Радионуклидная диагностика HER2-позитивного рака молочной железы (клинические исследования)

Тип белка	Название препарата	Способ визуализации	Категория пациентов	Ссылка
Полноразмерные антитела	<sup>111</sup> In-трастузумаб	ОФЭКТ/КТ	Метастатический РМЖ	[51–53]
	<sup>89</sup> Zr-трастузумаб	ПЭТ/КТ	Метастатический РМЖ	[54–56]
	<sup>64</sup> Cu-трастузумаб	ПЭТ/КТ	Первичный и метастатический РМЖ	[57, 58]
Фрагменты антител	<sup>68</sup> Ga- <i>DOTA-F(ab')<sub>2</sub></i> -трастузумаб	ПЭТ/КТ	Метастатический РМЖ	[59]
	<sup>68</sup> Ga-HER2-Нанободы	ПЭТ/КТ	Метастатический РМЖ	[60]
Альтернативные каркасные белки	<sup>111</sup> In-ABY-002 <sup>68</sup> Ga-ABY-002	ОФЭКТ/КТ ПЭТ/КТ	Метастатический РМЖ	[61]
	<sup>111</sup> In-ABY-025	ОФЭКТ/КТ	Местно-распространенный и метастатический РМЖ	[62, 63]
	<sup>68</sup> Ga-ABY-025	ПЭТ/КТ	Местно-распространенный и метастатический РМЖ	[63–65]
	<sup>99m</sup> Tc-ADAPT6	ОФЭКТ	Операбельный, местно-распространенный и метастатический РМЖ	[66]
	<sup>99m</sup> Tc-DARPinG3	ОФЭКТ	Операбельный, местно-распространенный и метастатический РМЖ	[67]



препарат « $^{111}\text{In}$ -трастузумаб» ( $^{111}\text{In}$ , период полураспада 2,8 дня) [50]. Сначала изучали преимущественно кардиотоксичность этого соединения. Так, в 2000 году Vehr и соавт. наблюдали 20 больных с HER2-положительным метастатическим раком молочной железы, получавших трастузумаб. Они оценивали потенциальный ответ опухоли на терапию, а также возможность прогнозирования кардиотоксичности на фоне проводимого лечения. По результатам этой работы был сделан вывод о возможности использования препарата в качестве предсказательного инструмента в отношении терапевтической эффективности и развития кардиотоксичности на фоне таргетной терапии (табл. 2) [51].

В свою очередь, Perik и соавт. использовали « $^{111}\text{In}$ -трастузумаб» у 17 пациенток с метастатическим HER2-позитивным раком молочной железы. Лишь у одной пациентки с тяжелой кардиотоксичностью выявлен слабый захват меченого белка; опухоли, сверхэкспрессирующие эпидермальный фактор роста типа 2, обнаружены в 45% случаев, что свидетельствовало об отсутствии диагностической значимости « $^{111}\text{In}$ -трастузумаб» для прогнозирования кардиотоксичности у пациенток данной категории [52].

Sietske и соавт. изучали накопление « $^{111}\text{In}$ -трастузумаб» в начале и через 14 недель после терапии герцептином 17 больных HER2-позитивным раком молочной железы. Результаты этого исследования выявили устойчивое поглощение препарата всеми опухолевыми очагами на протяжении всего курса лечения со снижением поглощения всего лишь на 20% к концу терапии. Этот анализ показал, что количество молекул рецептора HER2 на поверхности опухолевой клетки достаточно для связывания с таргетными препаратами; снижение же аккумуляции во многом объяснялось уменьшением объема злокачественных образований на фоне комбинированной химиотаргетной терапии, а также конкуренцией циркулирующего «терапевтического» трастузумаба с мечеными антителами за связывание с целевым рецептором. Полученный результат, по-видимому, можно объяснить недостаточной дозировкой используемого мкАТ и неполной блокировкой рецепторов HER2/neu соответственно [53].

Первое клиническое исследование препарата « $^{89}\text{Zr}$ -трастузумаб» ( $^{89}\text{Zr}$ , период полураспада 78,4 ч), проведенное на 14 больных метастатическим раком молочной железы, показало высокое накопление меченого антитела первичной опухолью и метастатическими узлами с положительным статусом HER2/neu через 4–5 дней после инъекции по данным ПЭТ-исследования (анатомическая локализация которых была сопоставимой с установленной методами компьютерной и магнитно-резонансной томо-

графии). Также были визуализированы метастазы рака молочной железы в головной мозг, обусловленные повреждением гематоэнцефалического барьера в месте метастазирования [54].

Препарат « $^{89}\text{Zr}$ -трастузумаб» изучали также Ulaner и соавт. Они провели проспективный клинический анализ 11 больных HER2-негативным раком молочной железы, на момент исследования имевших по крайней мере по одному метастатическому очагу. Через 5–6 дней после введения препарата у 4 из 11 больных (36%) по данным ПЭТ/КТ были выявлены метастатические очаги, гиперэкспрессирующие HER2/neu. Однако последующий иммуногистохимический и FISH-анализ опухолевой ткани показал, что для трех из четырех (75%) выявленных узлов результаты оказались ложноположительными. Возможно, столь высокая частота ложноположительных результатов могла быть обусловлена неспецифическим накоплением препарата в опухолевых очагах из-за большого размера его молекул [55].

Gebhart и соавт. в своем мультицентрическом клиническом исследовании (исследование ZEPHIR) оценивали возможность использования ПЭТ с  $^{89}\text{Zr}$ -трастузумабом и  $^{18}\text{F}$ -фтордезоксиглюкозой ( $^{18}\text{F}$ -ФДГ) для оценки эффективности терапии трастузумабом эмтанзином (T-DM1) у 56 больных с распространенным HER2-позитивным раком молочной железы. У 16 (29%) больных (ранее по данным ИГХ у них была выявлена высокая экспрессия HER2/neu в метастазах опухоли) не наблюдали накопления  $^{89}\text{Zr}$ -трастузумаба, а сочетание  $^{89}\text{Zr}$ -трастузумаба и  $^{18}\text{F}$ -фтордезоксиглюкозы позволяло в 100% случаев прогнозировать ответ опухоли на проводимое лечение [56].

Свойства и эффективность препарата  $^{64}\text{Cu}$ -трастузумаб (период полураспада  $^{64}\text{Cu}$  12,7 ч) изучали Tamura и соавт. и Mortimer и соавт. В первом случае ПЭТ-исследование шести больных с операбельным или метастатическим HER2-позитивным раком молочной железы показало безопасность этого препарата, хорошую визуализацию первичной опухоли и метастазов в головной мозг у двух больных [57]. Эффективность препарата подтверждена в исследовании Mortimer и соавт., проведенном на восьми больных метастатическим HER2-позитивным раком молочной железы. У всех пациенток отмечена хорошая визуализация как первичной опухоли, так и метастатических очагов в костях, лимфатических узлах, печени, легких и плевре [58]. При этом главным недостатком соединений с  $^{64}\text{Cu}$  является слишком короткий период полураспада.

Несмотря на положительные результаты, полученные в ходе многочисленных исследований, использование полноразмерных антител в качестве

«нацеливающего» модуля выявило и очевидные проблемы, связанные, прежде всего, с размером молекул иммуноглобулинов: медленное выведение мкАТ из организма, существенно снижающее чувствительность визуализации и пролонгирующее начало обследования до 4–7 дней после инъекции; заметно более высокая лучевая нагрузка на пациентов из-за использования долгоживущих источников излучения; медленные экстравазация и диффузия препаратов в интерстицию опухоли и неспецифическое накопление меченых соединений в опухоли (захват опухолью неспецифических антител), приводящее к высокому уровню ложноположительных результатов [68].

### **Радионуклидная диагностика HER2-положительного рака молочной железы с применением фрагментов антител**

Очевидная необходимость модификации больших размеров антител (150 кДа) и улучшения их фармакокинетики послужили пусковым моментом синтеза фрагментов антител Fab (около 55 кДа) и (Fab)<sub>2</sub> (около 110 кДа), полученных путем ферментативной обработки антител пепсином и папаином. Эти фрагменты не обладают эффекторными функциями (что обусловлено отсутствием домена Fc) и не способны к рециркуляции из лизосом. Фрагменты Fab и (Fab)<sub>2</sub> специфичны к молекулярным мишеням, как и «родительский» иммуноглобулин, с сохранением пространственной структуры. Оба фрагмента использовали для радионуклидной визуализации злокачественных образований, по результатам которой оценили их преимущества перед полноразмерными антителами, такие, как: более высокая скорость выведения из крови, сокращение времени между инъекцией и визуализацией, снижение поглощенной дозы для пациентов и лучшая контрастность в день инъекции или на следующий день после инъекции, что позволяет использовать относительно короткоживущие радионуклиды, такие, как <sup>99m</sup>Tc (T<sub>1/2</sub> = 6.01 ч) или позитронные излучатели со средним периодом полураспада – <sup>55</sup>Co (T<sub>1/2</sub> = 17.5 ч), <sup>64</sup>Cu (T<sub>1/2</sub> = 12.7 ч), <sup>76</sup>Br (T<sub>1/2</sub> = 16.2 ч) и <sup>86</sup>Y (T<sub>1/2</sub> = 14.7 ч) [69].

Единственным препаратом данной категории, прошедшим фазу I клинических испытаний, является «<sup>68</sup>Ga-DOTA-F(ab')<sub>2</sub>-трастузумаб», который вводили 16 больным метастатическим или первичным раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu. По данным Beylergil и соавт. соединение хорошо переносилось всеми пациентами без выраженных побочных и аллергических реакций, при этом отмечена его низкая чувствительность (50%): опухоль визуализирована лишь у четырех из восьми HER2-положительных больных и не визуализирована у па-

циентов с HER2-негативными опухолями [59]. В ходе доклинического и клинического исследования выявлены такие недостатки препаратов данной группы, существенно ограничивающие их использование в клинической практике, как снижение очевидной аффинности связывания по сравнению с моноклональными антителами и все еще существенные размеры для эффективной экстравазации.

Обнаружение верблужьих антител, состоящих только из тяжелых цепей (HcAbs), спровоцировало разработку антител третьего поколения, состоящих из одного вариабельного домена тяжелой цепи (V<sub>H</sub>H, ~ 15 кДа) в качестве антигенсвязывающей области и получивших название «нанотела», или «нанободи». Одна из точек приложения нанободи в клинической практике – молекулярная визуализация опухоли, в частности, их использование в ядерной медицине [70, 71]. Так, в фазе I клинического исследования оценили возможность применения препарата «<sup>68</sup>Ga-HER2-Нанободи» (период полураспада <sup>68</sup>Ga 67.7 мин) для выявления экспрессии рецептора HER2 с помощью ПЭТ/КТ у 20 пациенток с первичным или метастатическим раком молочной железы. Показана безопасность препарата и отсутствие побочных реакций при дозе облучения, сопоставимой с дозой других обычно используемых индикаторов ПЭТ, а также его быстрое выведение из кровотока и накопление преимущественно в почках, печени и кишечнике с низкой аккумуляцией в проекции молочной железы и регионарных лимфатических узлах [60]. В настоящий момент продолжается фаза II клинических исследований «<sup>68</sup>Ga-HER2-Нанободи», в которой определяется экспрессия HER2 в метастазах в головной мозг больных раком молочной железы [72].

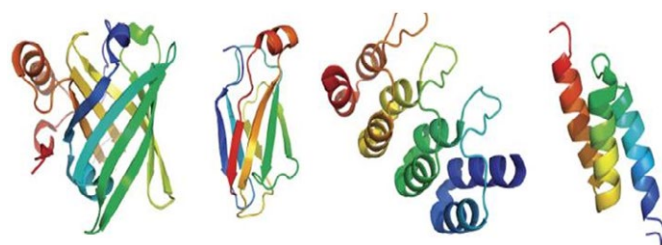
### **Радионуклидная диагностика HER2-положительного рака молочной железы с использованием альтернативных каркасных белков**

Поиск новых эффективных агентов, способных взаимодействовать со специфическими мишенями, и стремительное развитие методов генной инженерии положили начало интенсивному изучению и разработке молекулярных конструкций, альтернативных связывающим доменам антител. Эти конструкции должны иметь ряд обязательных характеристик, таких, как связывание исключительно с «таргетным» антигеном для специфической локализации, отсутствие иммуногенности, стабильность, возможность быстрой химической модификации при проведении процессов мечения, а также быстрое удаление несвязавшихся молекул из организма пациента для достижения высокого качества изображения опухолевых очагов и сокращения временного промежутка между инъекцией и началом исследования [73].

В течение последнего десятилетия большую популярность приобретает новый класс таргетных молекул, получивших название «альтернативные каркасные белки» (АКБ), или «скаффолды» (scaffolds), и отвечающих всем требованиям к оптимальной доставке радионуклида к опухолевым клеткам. Впервые термин «скаффолд» ввели Плюктун и соавт. для обозначения белкового каркаса, или остова, в котором путем небольших видоизменений аминокислотных последовательностей становится возможным получать различные варианты белка с разными функциями, среди которых находят варианты, эффективно связывающиеся со специфическими мишенями [74]. К несомненным преимуществам таких конструкций относятся значительно меньшие размеры по сравнению со стандартным антителом, что увеличивает проникновение вещества в опухоль, стабильная структура, дополнительная функционализация и экспрессия в бактериальной системе, обеспечивающие низкие затраты на производство, высокая термостабильность, способствующая длительному хранению препарата при комнатной температуре, а также возможность прямого химического синтеза [75].

Альтернативные каркасные белки можно классифицировать по различным критериям, таким, как размер, способ синтеза, происхождение и биологические функции. Одна из основных систем классификации предполагает разделение каркасных белков в соответствии с элементами структуры, что объясняется возможностью передачи их биологических свойств новым производным. Первый класс составляют соединения доменного строения (domain-sized compounds) (6–20 кДа), такие, как аффибоды (Affibody, Inc.), альбуминсвязывающие домены, имеющие сродство с белком (ADAPTs), аффилины (Scil Proteins GmbH), антикарины (Pierris, Inc.), атримеры (Anaphore, Inc.), дарпины (Dyax, Inc., Shire Inc.), Fn3 скаффолды (Molecular Partners, Inc.), финомерные платформы (Janssen), домены типа ингибитора Кунитца или пронектин (Protelica), последовательности на основе белка FN3 (Protelica, Inc.). Ко второму классу относятся пептиды с закрепленной структурой (constrained peptides) (2–4 кДа), такие, как авимеры (Avimers [Avidia, Inc.]), бициклические пептиды (Bicycle Therapeutics, Inc.) и цистеинсодержащие пептиды. На данный момент клиническую апробацию в диагностике HER2-положительного рака молочной железы прошли три представителя «скаффолдов»: аффибоды, адапты и дарпины (рис. 1) [76].

**Аффибоды.** Молекулы аффибоды представляют собой три плотно упакованные альфа-спирали, стабилизированные гидрофобным ядром [77].



Антикалин FN3 монободы Дарпин Аффибоды

**Рис. 1.** Схематичное изображение ряда альтернативных каркасных белков

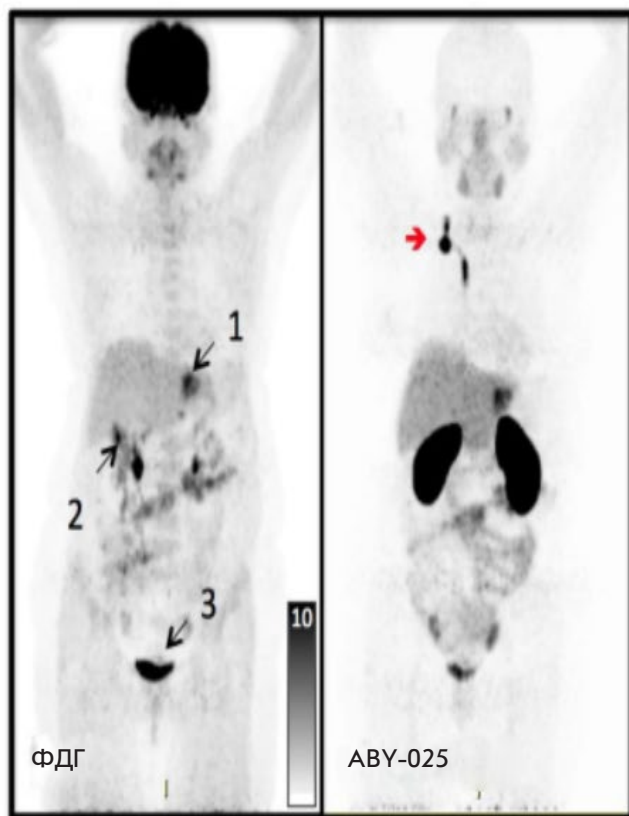
Аффибоды – это белки небольшого размера с молекулярной массой 6–7 кДа, состоящие из 58 аминокислотных остатков. Аффибоды имеют высокое сродство к рецепторам HER3, IGF-1R, CAIX и VEGFR2. В ходе доклинических исследований выявлен высокий потенциал аффибоды в качестве «нацеливающих» модулей для радионуклидной диагностики. Наибольшее количество исследований аффибоды проведено на варианте с высокой аффиностью к рецептору HER2/neu [78].

Первым вариантом аффибоды, изученным в клинической практике, стала молекула АВУ-002, меченая  $^{111}\text{In}$  и  $^{68}\text{Ga}$ . В своем исследовании Baum и соавт. выявили отсутствие токсичности препаратов « $^{111}\text{In}$ -АВУ-002» и « $^{68}\text{Ga}$ -АВУ-002» у больных раком молочной железы, а также их быстрый клиренс из нормальных тканей. Однако сканирование в режиме «Whole body» через 1, 2 и 4 ч после введения меченых белков обнаружило их высокое накопление в печени и почках [61].

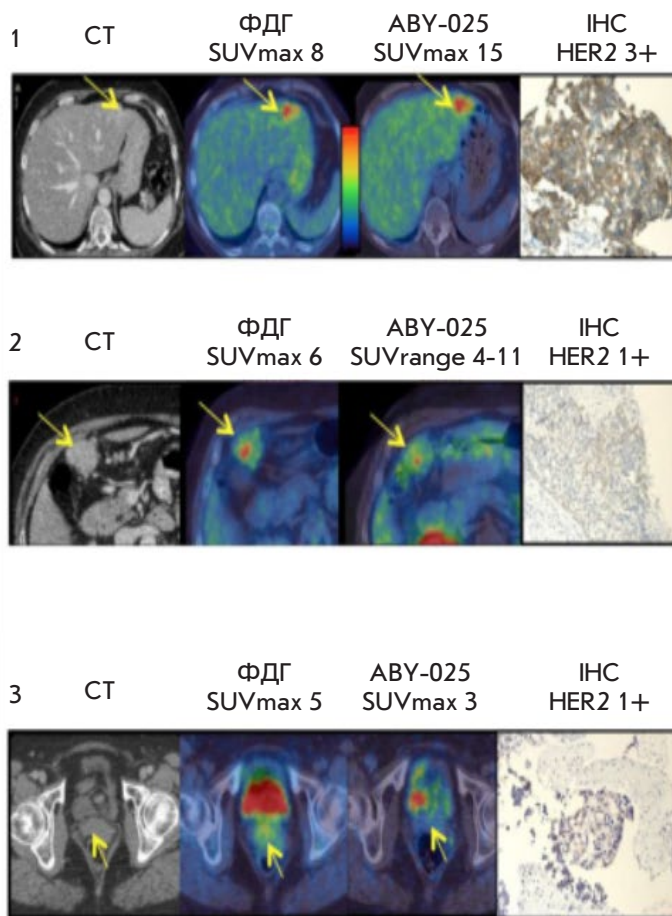
Путем последующего реинжиниринга создана модифицированная молекула аффибоды II поколения – АВУ-025. В фазе I клинического исследования препарата « $^{111}\text{In}$ -АВУ-025» на семи больных с местно-распространенным и метастатическим раком молочной железы (пять пациенток со сверхэкспрессией HER2/neu; две – без экспрессии рецептора) Sorensen и соавт. показали безопасность данного соединения и возможность дифференцировки первичной опухоли и метастатических очагов в зависимости от статуса HER2/neu [62]. Однако, несмотря на многообещающие результаты, была обнаружена ограниченная возможность визуализации очагов небольших размеров у HER2-положительных пациентов при использовании « $^{111}\text{In}$ -АВУ-025», что, вероятно, обусловлено низким разрешением ОФЭКТ/КТ. Поэтому началось изучение препарата « $^{68}\text{Ga}$ -АВУ-025» для ПЭТ/КТ. Фаза I клинического исследования показала отсутствие токсического воздействия соединения на организм восьми больных метастатическим раком молочной железы. Кроме того, показана важность дозы препарата, так при-



HER2-негативный первичный узел МЖ,  
гетерогенная экспрессия HER2/neu  
в метастазе



→ Место введения



**Рис. 2.** Пациентка с HER2-негативной первичной опухолью молочной железы. По данным ФДГ-ПЭТ/КТ у больной визуализированы метастазы в левую долю печени, перитонеальные лимфатические узлы и шейку мочевого пузыря. Исследование с  $^{68}\text{Ga-ABY-025}$  выявило высокую аккумуляцию соединения в печеночный метастаз и низкую или отсутствие в остальные очаги. По данным ИГХ статус HER2/neu метастаза в печень – положительный; в остальных очагах – отрицательный

менение 78 мкг белка приводило к статистически более высокому накоплению препарата в печени и почках по сравнению с аккумуляцией при использовании 427 мкг белка [63]. Последующий анализ 16 больных метастатическим раком молочной железы (12 со сверхэкспрессией HER2/neu; четверо – без) показал не только возможность визуализации метастатических узлов (метастазы в регионарные лимфатические узлы и отдаленные органы и ткани) во всех случаях, но и их точной дифференцировки в зависимости от статуса HER2/neu у больных метастатическим раком молочной железы (рис. 2) [64].

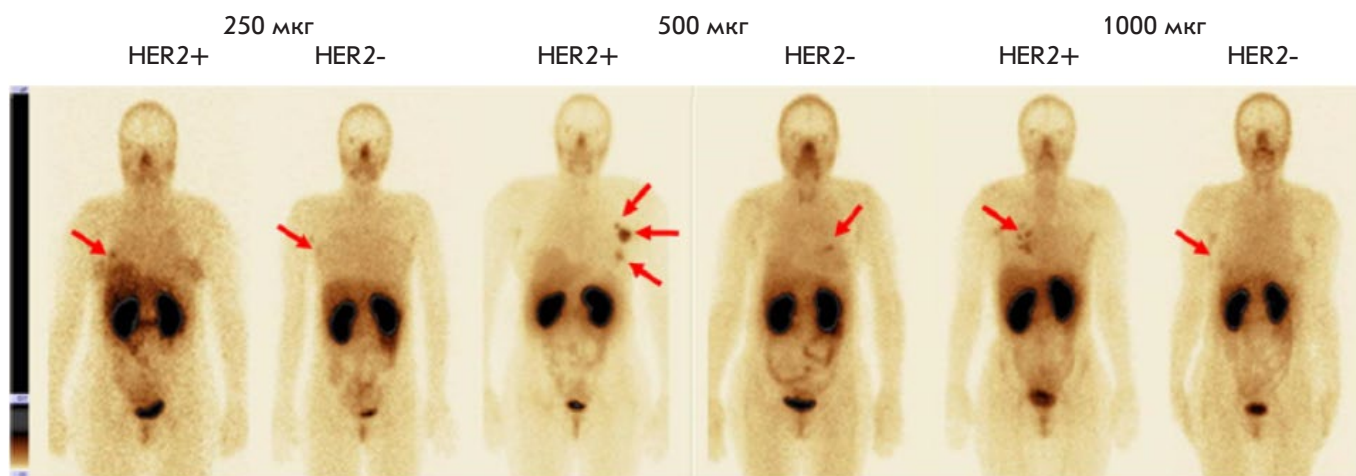
Кроме того, Sandberg и соавт. на 23 пациентках с метастатическим раком молочной железы показали, что в случае препаратов  $^{111}\text{In-ABY-025}$  и  $^{68}\text{Ga-ABY-025}$  селезенка была лучшим референсным органом по всем модальностям (за ней следовали пул крови и легкие). При этом соотношение опухоль/селезенка достигало точности 100% при разделении

опухолевых узлов в зависимости от статуса HER2/neu через 4 ч после инъекции, по данным ПЭТ, и 24 ч – ОФЭКТ [65].

Высокая эффективность меченой молекулы аффибоди подтверждена Ху Y. и соавт., которые в предварительном клиническом исследовании препарата  $^{68}\text{Ga-NOTA-MAL-Cys-MZHER2:342}$ , выполненном на двух пациентках, показали более высокое накопление соединения в опухоли молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu [79].

**ADAPT (ABD-Derived Affinity Proteins).** Эти молекулы разработаны с использованием 46-аминокислотного каркаса, полученного из альбумин-связывающего домена (АСД), который спонтанно складывается в трехспиральную структуру и не зависит от дисульфидных мостиков. Командой Хобер (Королевский технологический институт, Стокгольм, Швеция) создана библиотека, позволяющая синте-





**Рис. 3.** Передняя проекция планарной сцинтиграфии больных раком молочной железы, экспрессирующих и не экспрессирующих HER2/neu (HER2+ и HER2-) через 2 ч после инъекции 250, 500 и 1000 мкг препарата «<sup>99m</sup>Tc-ADAPT6» (стрелками указана опухоль молочной железы)

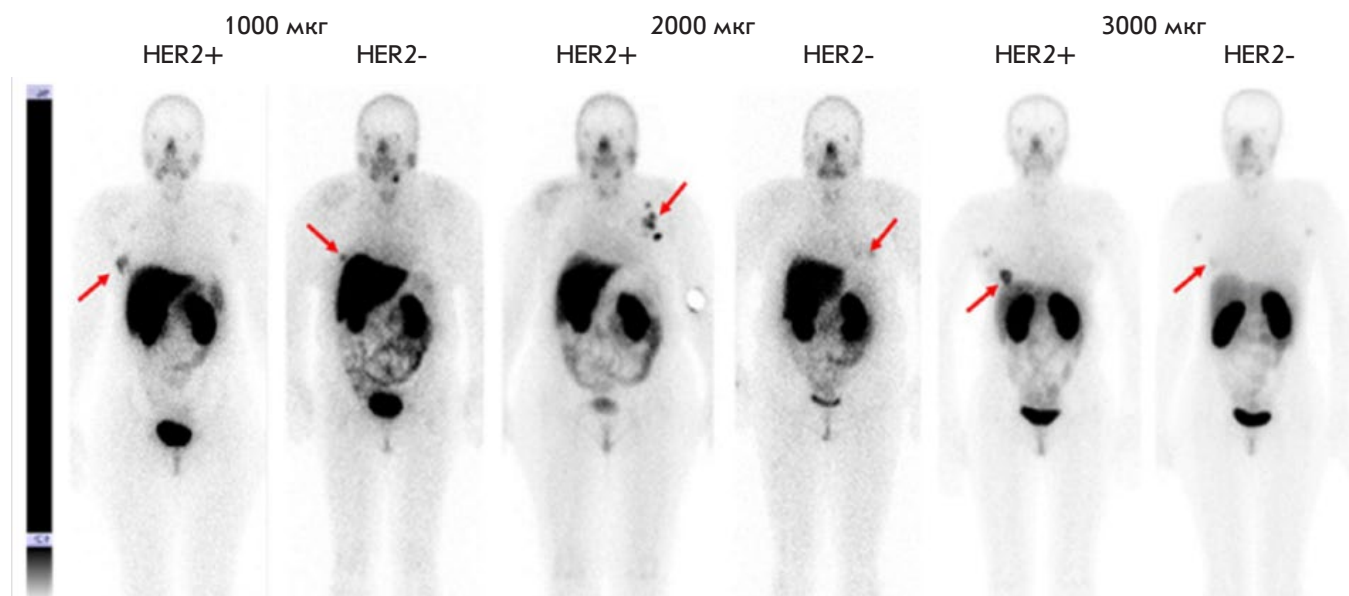
зировать АСД для различных мишеней, вариантами служили молекулы, нацеленные на различные рецепторы TNF $\alpha$ , HER3 [80]. Тропная к рецептору эпидермального фактора роста HER2/neu молекула ADAPT6 была выбрана из-за ее высокого сродства к HER2/neu (1 нМ) и быстрого выведения из кровотока в связи с низким связыванием с альбумином [81].

В фазе I клинических исследований препарата «<sup>99m</sup>Tc-ADAPT6» (<sup>99m</sup>Tc, период полураспада 6.01 ч), в которое вошли 22 больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu в первичной опухоли. В исследовании использовали три дозировки белка (250, 500 и 1000 мкг). Через 2, 4, 6 и 24 ч после введения меченого белка всем больным выполняли планарную сцинтиграфию в режиме Wholebody и однофотонную компьютерную томографию органов грудной клетки. Результаты исследования показали хорошую переносимость препарата и отсутствие изменений со стороны жизненно важных органов. Лучшее различие в распределении препарата в опухолях с положительным и отрицательным статусами HER2/neu наблюдали через 2 ч после инъекции соединения в дозе 500 мкг (среднее значение опухоль/фон  $37 \pm 19$  для HER2-положительных опухолей и с  $5 \pm 2$  для HER2-негативных,  $p < 0.05$ , тест Манна–Уитни). Различие между группами на других временных отрезках не было статистически значимым. Соотношение опухоль/фон в HER2-положительных опухолях было значительно выше у пациенток, получивших дозу 500 мкг по сравнению с 250 и 1000 мкг ( $p < 0.05$ , тест Манна–Уитни). Кроме того, определена относительно низкая дозовая нагрузка на пациента при использовании 500 и 1000 мкг белка –  $0.009 \pm 0.002$  и  $0.010 \pm 0.003$  мЗв/МБк соответственно, что сопоставимо с данными, полу-

ченными при изучении других представителей АКБ (рис. 3) [66, 82].

**Дарпины** (DARPinS – Designed Ankyrin Repeat Proteins) – представители АКБ, сконструированные на основе белков анкиринов. Анкирины участвуют в прикреплении мембранных белков к цитоскелету [83]. Каркас дарпинов может включать 4–6 анкириновых доменов, каждый из которых содержит 33 аминокислотных остатка; домены организованы как две антипараллельные альфа-спирали с бета-поворотом между ними [84]. Поскольку молекулярная масса одного модуля чуть больше 3.5 кДа, а дарпины состоят из 4–6 модулей, их молекулярная масса колеблется от 14 до 21 кДа и составляет примерно одну десятую размера обычного антитела (IgG) или одну треть размера Fab [85]. Доклинические исследования различных вариаций дарпинов показали их высокую тропность и специфичность к рецептору HER2/neu [86, 87].

Проведена фаза I клинических исследований препарата «<sup>99m</sup>Tc-DARPinG3» в дозе: 1000, 2000 и 3000 мкг, в которое вошли 28 больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu. Пациенткам выполняли планарную сцинтиграфию в режиме Wholebody и однофотонную компьютерную томографию органов грудной клетки через 2, 4, 6 и 24 ч после введения препарата. Показано отсутствие токсического воздействия препарата в использованных дозах «<sup>99m</sup>Tc-DARPinG3» на организм за весь период наблюдения, быстрое его выведение с током крови, а также относительно низкая дозовая нагрузка на пациента ( $0.011 \pm 0.001$ ,  $0.012 \pm 0.006$  и  $0.012 \pm 0.003$  мЗв/МБк соответственно) (рис. 4). Лучшее соотношение опухоль/фон отмечено у больных со сверх-



**Рис. 4.** Передняя проекция планарной сцинтиграфии больных раком молочной железы, экспрессирующих (HER2+) и не экспрессирующих (HER2-) HER2/neu через 4 ч после инъекции 1000, 2000 и 3000 мкг препарата « $^{99m}\text{Tc-DARPinG3}$ » (стрелками указана опухоль молочной железы)

экспрессией HER2/neu в опухоли через 2 и 4 ч после инъекции 1000 и 2000 мкг меченого белка; и через 2, 4 и 6 ч в подгруппе, получившей 3000 мкг ( $p < 0.05$ , тест Манна–Уитни). При этом наиболее эффективной дозой, позволяющей визуализировать метастазы в печени, оказалась доза 3000 мкг [67].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика HER2-положительного рака молочной железы остается одной из не до конца решенных проблем клинической онкологии. Ни один из существующих методов диагностики не позволяет полностью решить поставленные задачи и, как правило, требует проведения дополнительных дорогостоящих, инвазивных и порой влекущих за собой различные осложнения манипуляций [26, 28]. Эта проблема становится особенно очевидной при решении вопроса о молекулярных характеристиках выявленных опухолевых узлов (метастазов) и выборе оптимального объема системного лечения.

В настоящее время стремительно развиваются методы таргетной радионуклидной визуализации, которые расширяют возможности диагностики злокачественных образований [88]. Информация, представленная в данном обзоре, позволяет более детально взглянуть на эволюцию радионуклидной диагностики HER2-положительного рака молочной железы с использованием в качестве «нацеливающего» модуля различных структур – от «полноразмерных» антител до новой группы синтетических белков небольшого размера – альтернативных каркасных белков, представленных разнообразными молекулярными

формами с различными структурами, зарядами и липофильностью аминокислотных остатков, подверженных воздействию растворителя. Многочисленные доклинические исследования меченых белков определили оптимальные характеристики скаффолдов для молекулярной визуализации, а также их высокую специфичность к таргетной мишени.

Проведенные к настоящему времени клинические исследования соединений на основе таких белков, как аффибоды, адапты и дарпины для ОФЭКТ и ПЭТ, показали их хорошую переносимость, быстрое выведение из организма и возможность дифференцировки опухолевых очагов в зависимости от статуса рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu. Неоспоримым преимуществом методов данного типа перед стандартными диагностическими подходами (FISH и ИГХ) является возможность одномоментного выявления дополнительных опухолевых узлов и определения их молекулярного фенотипа. Убедительные результаты, полученные в ходе первых клинических испытаний, свидетельствуют о перспективности таргетной радионуклидной диагностики и необходимости продолжения исследований в данном направлении. ●

*Работа выполнена в рамках гранта Министерства науки и высшего образования, соглашение № 075-15-2022-1103 по теме «Разработка таргетных молекул на основе каркасных белков для диагностики и терапии злокачественных новообразований: тераностический подход».*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ» Минздрава России, 2020. 251 с.
2. Lambertini M., Viglietti G. // *Oncotarget*. 2019. V. 10. № 8. P. 803–804. doi: 10.18632/oncotarget.26611
3. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2018. V. 68. № 6. P. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492
4. Cardoso F., Kyriakides S., Ohno S., Penault-Llorca F., Poortmans P., Rubio I.T., Zackrisson S., Senkus E. // *Ann. Oncol.* 2019. V. 30. № 8. P. 1194–1220. doi: 10.1093/annonc/mdz173
5. Carioli G., Malvezzi M., Rodriguez T., Bertuccio P., Negri E., Vecchia C. // *Breast*. 2017. V. 36. P. 89–95. doi: 10.1016/j.breast.2017.06.003
6. Sachdev J.C., Sandoval A.C., Jahanzeb M. // *Cancer Treat. Res.* 2019. V. 178. P. 45–80. doi: 10.1007/978-3-030-16391-4\_2
7. Arranja A.G., Pathak V., Lammers T., Shi Y. // *Pharmacol. Res.* 2017. V. 115. P. 87–95. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.014
8. Navalkisoor S., Gnanasegaran G., Baum R. // *Br. J. Radiol.* 2018. V. 91. № 1091. P. 20189004. doi: 10.1259/bjr.20189004
9. Turner J.H. // *Br. J. Radiol.* 2018. V. 91. № 1091. P. 20180440. doi: 10.1259/bjr.20180440
10. Langbein T., Weber W.A., Eiber M. // *J. Nucl. Med.* 2019. V. 60. № 9 (Suppl. 2). P. 13S–19S. doi:10.2967/jnumed.118.220566.
11. Lymperopoulos G., Lymperopoulos P., Alikari V., Dafo-gianni C., Zyga S., Margari N. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 989. P. 119–128. doi: 10.1007/978-3-319-57348-9\_10
12. Wiesing U. // *Med. Hlth Care Philos.* 2019. V. 22. № 4. P. 593–597. doi: 10.1007/s11019-019-09898-3.
13. Duffy M.J., Harbeck N., Nap M., Molina R., Nicolini A., Senkus E., Cardoso F. // *Eur. J. Cancer*. 2017. V. 75. P. 284–298. doi: 10.1016/j.ejca.2017.01.017
14. Nagini S. // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2017. V. 17. P. 152–163. doi: 10.2174/1871520616666160502122724
15. Broughton M.N., Westgaard A., Paus E., Øijordsbakken M., Henanger K.J., Naume B., Bjoro T. // *Tumour Biol.* 2017. V. 39. № 6. P. 1010428317707436. doi: 10.1177/1010428317707436
16. Han L., Li L., Wang N., Xiong Y., Li Y., Gu Y. // *Interferon Cytokine Res.* 2018. V. 38. № 12. P. 578–582. doi: 10.1089/jir.2018.0085
17. Ahn S., Woo J.W., Lee K., Park S.Y. // *J. Pathol. Transl. Med.* 2020. V. 54. № 1. P. 34–44. doi: 10.4132/jptm.2019.11.03
18. Schwill M., Tamaskovic R., Gajadhar A.S., Kast F., White F.M., Pluckthun A. // *Sci. Signal.* 2019. V. 12. № 565. P. eaau2875. doi: 10.1126/scisignal.aau2875
19. Pareek A., Singh O.P., Yogi V., Ghori H.U., Tiwari V., Redhu P. // *Cancer Res. Ther.* 2019. V. 15. № 5. P. 971–975. doi: 10.4103/jcrt.JCRT\_235\_18
20. Waks A.G., Winer E.P. // *J. Am. Med. Assoc.* 2019. V. 321. № 3. P. 288–300. doi: 10.1001/jama.2018.19323
21. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. // *Science*. 1987. V. 235. № 4785. P. 177–182. doi: 10.1126/science.3798106.
22. Marshall D.A., Ferrusi I.L., Trudeau M., Leigh N.B., Hoch J.S., Grazziotin L.R., Khong H., Pullenayegum E., Earle G.C. // *J. Oncol. Pharm. Pract.* 2020. V. 26. № 2. P. 379–385. doi: 10.1177/1078155219850299
23. Pernas S., Tolaney S.M. // *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2019. V. 11. P. 1758835919833519. doi: 10.1177/1758835919833519
24. Tsai Y.F., Tseng L.M., Lien P.J., Hsu C., Lin Y., King K., Wang Y., Chao T., Liu C., Chiu J., et al. // *Histopathology*. 2019. V. 74. № 4. P. 578–586. doi: 10.1111/his.13801
25. Stewart R.L., Caron J.E., Gulbahce E.H., Factor R.E., Geiersbach K.B., Downs-Kelly E. // *Mod. Pathol.* 2017. V. 30. № 11. P. 1561–1566. doi: 10.1038/modpathol.2017.65
26. Agersborg S., Mixon C., Nguyen T., Aithal S., Sudarsanam S., Blocker F., Weiss L., Gasparini R., Jiang S., Chen W., et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2018. V. 170. № 2. P. 321–328. doi: 10.1007/s10549-018-4755-5
27. Bo W., Ding W., Sun K., Wang X., Xu L., Teng X. // *Sci. Rept.* 2019. V. 9. P. 16726. doi: 10.1038/s41598-019-53003-w
28. Furerr D., Jacobs S., Caron C., Sanschagrin F., Provencher L., Diorio C. // *Anticancer Res.* 2017. V. 37. P. 3323–3329. doi: 10.21873/anticancer.11701
29. Schrijver W., Suijkerbuijk K.P.M., van Gils C.H., van der Wall E., Moelans C.B., van Diest P.J. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2018. V. 110. № 6. P. 568–580. doi: 10.1093/jnci/djx273.
30. Kroigard A.B., Larsen M.J., Thomassen M., Kruze T.A. // *Breast J.* 2016. V. 22. № 4. P. 420–430. doi: 10.1111/tbj.12596
31. Raica M., Cimpean A.M., Ceasu R.A., Fulga V., Nica C., Rudico L., Sapefrati L. // *Anticancer Res.* 2014. V. 34. P. 1435–1440.
32. Lower E.E., Khan S., Kennedy D., Baughman R.P. // *Breast Cancer – Targets and Therapy*. 2017. V. 9. P. 515–520. doi: 10.2147/BCTT.S137709
33. Turner N.H., Di Leo A. // *Cancer Treat. Rev.* 2013. V. 39. № 8. P. 947–957. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.05.003
34. Griguelo G., Pascual T., Dieci M.V., Guarneri V., Prat A. // *J. Immunother. Cancer*. 2019. V. 7. № 1. P. 90. doi: 0.1186/s40425-019-0548-6
35. Ocaña A., Amir E., Pandiella A. // *Breast Cancer Res.* 2020. V. 22. № 1. P. 15. doi: 10.1186/s13058-020-1252-7
36. Muller K., Marotti J., Tafe L. // *Am. J. Clin. Pathol.* 2019. V. 152. № 1. P. 10. doi: 10.1093/ajcp/azq210
37. Pekar G., Kasselaki I., Pekar-Lukacs A., Dekany C., Hellberg D., Tot T. // *Histopathology*. 2019. V. 74. № 2. P. 300–310. doi: 10.1111/his.13733 гетерогенность
38. Jadvar H., Chen X., Cai W., Mahmood U. // *Radiology*. 2018. V. 286. № 1. P. 388–400. doi: 10.1148/radiol.2017170346
39. Stéen E.J.L., Edem P.E., Nørregaard K., Jorgensen J.T., Shalgunov V., Kjaer A., Herth M.M. // *Biomaterials*. 2018. V. 179. P. 209–245. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.021
40. Li L., Wu Y., Wang Z., Jia B., Hu Z., Dong C., Wang F. // *J. Nucl. Med.* 2017. V. 58. P. 821–826. doi: 10.2967/jnumed.116.183863
41. Ljungberg M., Pretorius P.H. // *Br. J. Radiol.* 2018. V. 91. № 1081. P. 20160402. doi: 10.1259/bjr.20160402
42. Massicano A.V.F., Marquez-Nostra B.V., Lapi S.E. // *Mol. Imaging*. 2018. V. 17. P. 1–11.
43. Gallivanone F., Valente M., Savi A., Canevari C., Castiglioni I. // *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2017. V. 22. P. 1750–1759. doi: 10.2741/4569
44. Pandit-Taskar N.J. // *Med. Imaging Radiat. Sci.* 2019. V. 50. № 4 (Suppl. 1). P. 41–44. https://doi.org/10.1016/j.jmir.2019.07.006
45. Tolmachev V., Orlova A., Sorensen J. // *Semin Cancer Biol.* 2021. V. 72. P. 185–197. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.10.005
46. Garousi J., Orlova A., Freid F.Y., Tolmachev V. // *EJNMMI Radiopharmacy Chem.* 2020. V. 5. P. 16. doi: 10.1186/s41181-020-00094-w
47. Hanack K., Messerschmidt K., Listek M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 917. P. 11–22. doi: 10.1007/978-3-319-32805-8\_2
48. Ovacik M., Lin K. // *Clin. Transl. Sci.* 2018. V. 11. № 6. P. 540–552. doi: 10.1111/cts.12567
49. Mueller C., Haymond A., Davis J.B., Williams A., Espina V. // *Expert Rev. Proteomics*. 2018. V. 15. № 2. P. 131–152. doi: 10.1080/14789450.2018.1421071
50. Gebhart G., Flamen P., DeVries E.G.E., Jhaveri K., Wimana



- Z. // *J. Nucl. Med.* 2016. V. 57. № 2 (Suppl. 1). P. 81S–88S. doi: 10.2967/jnumed.115.157941
51. Behr T.M., Behe M., Wormann B. // *N. Engl. J. Med.* 2001. V. 345. № 13. P. 995–996. doi: 10.1056/NEJM200109273451312
52. Perik P.J., Hooge M.L., Gietema J.A., Graaf W.T., Korte M.A., Jonkman S., Kosterink J.G., Veldhuisen D.J., Sleifer D.T., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2006. V. 20. № 15. P. 2276–2282.
53. Sietske B.M., de Jong J., Perik P.J., Brouwers H., Schroder C.P., Munnink T., Bongaerts A.H.H., de Vries E.G.E., Hooge M.N. // *Mol. Imaging.* 2014. V. 13. P. 1–6. doi: 10.2310/7290.2014.00011
54. Dijkers E.C., Munnink T.H., Kosterink J.G., Brouwers A.H., Jager P.L., Jong J.R., Dongen G.A., Schroder C.P., Hooge M.N., Vries E.G. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010. V. 87. № 5. P. 586–592. doi: 10.1038/clpt.2010.12
55. Ulaner G.A., Hyman D.M., Lyashchenko S.K., Lewis J.S., Carrasquillo J.A. // *Clin. Nucl. Med.* 2017. V. 42. P. 912–917. doi: 10.1097/RLU.0000000000001820
56. Gebhart G., Lamberts L.E., Wimana Z., Garcia C., Emonts P., Ameye L., Stroobants S., Huizing M., Aftimos P., Tol J., et al. // *Ann. Oncol.* 2016. V. 27. № 4. P. 619–624. doi: 10.1093/annonc/mdv577
57. Tamura K., Kurihara H., Yonemori K., Tsuda H., Suzuki J., Kona Y., Honda N., Kodaira M., Yamamoto H., Yunokawa M., et al. // *J. Nucl. Med.* 2013. V. 54. № 11. P. 1869–1875. doi: 10.2967/jnumed.112.118612
58. Mortimer J.E., Balding J.R., Colcher D.M., Conti P.S., Frankel P.H., Carrol M.I., Tong S., Poku E., Miles J.K., Shively J.E., et al. // *J. Nucl. Med.* 2014. V. 55. № 1. P. 23–29. doi: 10.2967/jnumed.113.122630
59. Beylertgil V., Morris P.G., Smith-Jones P.M., Modi S., Solit D., Hudis C.A., Lu Y., O'Donoghue J., Lyashchenko S.K., Carrasquillo J.A., et al. // *Nucl. Med. Commun.* 2013. V. 34. № 12. P. 1157–1165. doi: 10.1097/MNM.0b013e328328365d99b
60. Keyaerts M., Xavier C., Heemskerk J., Devoogdt N., Evraert H., Ackaert C., Vanhoeij M., Duhoux F.P., Gevaert T., Simon P., et al. // *J. Nucl. Med.* 2016. V. 57. № 1. P. 27–33. doi: 10.2967/jnumed.115.162024
61. Baum R.P., Prasad V., Muller D., Schuchardt C., Orlova A., Wennborg A., Tolmachev V., Feldwisch J. // *J. Nucl. Med.* 2010. V. 51. № 6. P. 892–897. doi: 10.2967/jnumed.109.073239
62. Sorensen J., Sandberg D., Sandstrom M., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V., Astrom G., Lubberink M., Garske-Roman U., Carlsson J., Lindman H. // *J. Nucl. Med.* 2014. V. 55. № 5. P. 730–735. doi: 10.2967/jnumed.113.131243
63. Sandström M., Lindskog K., Velikyan I., Wennborg A., Feldwisch J., Sandberg D., Tolmachev V., Orlova A., Sorensen J., Carlson J., et al. // *J. Nucl. Med.* 2016. V. 57. № 6. P. 86–71. doi: 10.2967/jnumed.115.169342
64. Sorensen J., Velikyan I., Sandberg D., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V., Orlova A., Sandstrom M., Lubberink M., Olofsson H., Carlsson J., et al. // *Theranostics.* 2016. V. 6. № 2. P. 262–271. doi: 10.7150/thno.13502
65. Sandberg D., Tolmachev V., Velikyan I., Olofsson H., Wennborg A., Feldwisch J., Carlsson J., Lindman H., Sorensen J. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2017. V. 44. P. 1337–1346. doi: 10.1007/s00259-017-3650-3
66. Bragina O., von Witting E., Garousi J., Zelchan R., Sandstrom M., Orlova A., Medvedeva A., Doroshenko A., Vorobyeva A., Lindbo S., et al. // *J. Nucl. Med.* 2021. V. 62. № 4. P. 493–499. doi: 10.2967/jnumed.120.248799
67. Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A., Orlova A., Tashireva L., Sorensen J., Zelchan R., et al. // *J. Nucl. Med.* 2021. V. 63. № 4. P. 528–535. doi: jnumed.121.262542. doi: 10.2967/jnumed.121.262542
68. Sivelse C., Sierocki R., Ferreira-Pinto K., Simon S., Maillere B., Nozach H. // *MAbs.* 2018. V. 10. № 5. P. 720–729. doi: 10.1080/19420862.2018
69. Gebauer M., Skerra A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 60. P. 230–241. doi: 10.1016/j.copbio.2019.05.007
70. Yang E.Y., Shan K. // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. P. 1182. doi: 10.3389/fonc.2020.01182
71. Kijanka M., Dorresteyn B., Oliveira S., van Bergen P.M.P. // *Nanomedicine.* 2015. V. 10. № 1. P. 161–174. doi: 10.2217/nmm.14.178
72. Keyaerts M., Xavier C., Everaet H., Vaneycken I., Fontaine C., Decoster L., Vanhoeij M., Cavelier V., Lahoutte T. // *Ann. Oncol.* 2019. V. 30. Suppl. 3. P. III25–III26. doi: 10.1093/annonc/mdz095.081
73. Шипунова В.О., Деев С.М. // *Acta Naturae.* 2022. Т. 14. № 1(52). С. 54–72. doi: 10.32607/actanaturae.11545
74. Martin H.L., Bedford R., Heseltine S.J., Tang A.A., Haza K.Z., Rao A., Mcpherson M.J., Tomlinson D.C. // *Biotechnol.* 2018. V. 45. P. 28–35. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.02.008
75. Krasniqi A., D'Huyvetter M., Devoogdt N., Frejd F.Y., Sorensen J., Orlova A., Keyaerts M., Tolmachev V. // *J. Nucl. Med.* 2018. V. 59. P. 885–891. doi: 10.2967/jnumed.117.199901
76. Брагина О.Д., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Ларькина М.С. // *Бюл. сиб. мед.* 2019. Т. 18. № 3. С. 125–133. https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-125-133
77. Tolmachev V., Tran T.A., Rosik D., Sjoberg A., Abrahamson L., Orlova A. // *J. Nucl. Med.* 2012. V. 53. P. 953–960. doi: 10.2967/jnumed.111.101527
78. Tolmachev V., Gronroos T.J., Yim C.B., Garosi J., Yue Y., Grimm S., Rajander J., Perols A., Haaparanta-Solin M., Solin O., Ferdani R., Orlova A., Anderson C.J., Karlstrom A.E. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 6542. doi: 10.1038/s41598-018-24785-2
79. Xu Y., Wang L., Pan D., Yu C., Mi B., Huang Q., Sheng J., Yan J., Wang X., Yang R., Yang M. // *Br. J. Radiol.* 2019. V. 92. № 1104. P. 20190425. doi: 10.1259/bjr.20190425
80. Garousi J., Lindbo S., Borin J., von Witting E., Vorobyeva A., Oroujeni M., Mitran B., Orlova A., Buijs J., Tolmachev V., et al. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2019. V. 134. P. 37–48. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.11.004
81. von Witting E., Garousi J., Lindbo S., Vorobyeva A., Altai M., Oroujeni M., Mitran B., Orlova A., Hober S., Tolmachev V. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2019. V. 140. P. 109–120. doi: 10.1016/j.ejpb.2019.05.008
82. Брагина О.Д., Чернов В.И., Гарбуков Е.Ю., Дорошенко А.В., Воробьева А.Г., Орлова А.М., Толмачев В.М. // *Бюл. сиб. мед.* 2021. Т. 20. № 1. С. 23–30. https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-1-23-30
83. Plückthun A. // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. V. 55. P. 489–511. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654
84. Stumpp M.T., Dawson K.M., Binz H.K. // *BioDrugs.* 2020. V. 34. № 4. P. 423–433. doi: 10.1007/s40259-020-00429-8
85. Shilova O.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2019. V. 11. № 4. P. 42–53. doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-42-53
86. Vorobyeva A., Garousi J., Tolmachev V., Shulga A., Konovalova E., Deyev S., Gul R., Lofblom J., Sandstrom M., Chernov V., et al. // *Sci. Rept.* 2019. V. 9. № 1. P. 9405. doi: 10.1038/s41598-019-45795-8
87. Vorobyeva A., Bragina O., Altai M., Mitran B., Orlova A., Shulga A., Proshkina G., Chernov V., Tolmachev V., Deyev S. // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2018. V. 2018. P. 6930425. doi: 10.1155/2018/6930425
88. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. // *Rus. Chem. Rev.* 2022. V. 91. RCR5034. https://doi.org/10.1070/RCR5034



УДК 577.113.3 : 577.15 : 615.281.8

# Фавипиравир и его структурные аналоги: антивирусная активность, способы синтеза

И. Д. Константинова<sup>1\*</sup>, В. Л. Андропова<sup>1,2</sup>, И. В. Фатеев<sup>1</sup>, Р. С. Есипов<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения России, Москва, 123098 Россия

\*E-mail: kid1968@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.12.2021

Принята к печати 27.04.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11652

**РЕФЕРАТ** Противовирусные соединения на основе 1,4-пиазин-3-карбоксамидов активно изучаются последние 20 лет. Одно из соединений этого класса – фавипиравир (6-фтор-3-гидроксипиазин-2-карбоксамид, T-705) – в ряде стран разрешен к применению против гриппозной инфекции. В настоящее время фавипиравир используют в качестве средства против COVID-19. В обзоре описаны метаболизм фавипиравира *in vivo*, механизм его противовирусного действия, результаты клинического изучения, токсические свойства, химические подходы к его получению. Приведены данные о синтезе и противовирусной активности структурных аналогов фавипиравира, в том числе нуклеозидов и нуклеотидов на их основе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** 6-фтор-3-гидроксипиазин-2-карбоксамид, фавипиравир, пиазин-2-карбоксамид, грипп, SARS-CoV-2.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БОЕ – бляшкообразующая единица; ГТФ – гуанозин-5'-трифосфат; ТЦИД<sub>50</sub> – 50% тканевая цитопатическая инфекционная доза; ИВЛ – искусственная вентиляция легких; КТ – компьютерная томография; АРРТ – аденин-фосфорибозилтрансфераза; Vz – бензоильная защитная группа; СНІKV – вирус Чикунгунья; СС<sub>50</sub> – 50% цитотоксическая концентрация; DCI – дицианоимидазол; DENV – вирус денге; EBOV – вирус Эбола; ЕС<sub>50</sub> – 50% ингибирующая концентрация; HCV – вирус гепатита С; HEK293 – клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека; HGPRT – гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансфераза; HPRT – гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза; HGXPRT – гипоксантингуанинксантин-фосфорибозилтрансфераза; HMDS – гексаметилдисилазан; MDCK – линии клеток почки собаки Madin-Darby; NCS – N-хлорсукцинимид; NMNAT – никотинамидмононуклеотид-аденилтрансфераза; PNP – пурин-нуклеозидфосфорилаза; PRPP – 5-фосфорибозил-1-альфа-пирофосфат; RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза; RDP – рибозо-5'-пирофосфат; RMP – рибозо-5'-монофосфат; RTP – рибозо-5'-трифосфат; SARS – тяжелый острый респираторный синдром; SI – индекс селективности (СС<sub>50</sub>/ЕС<sub>50</sub>); SOC – стандарт терапии; T-1105 – 3-гидроксипиазин-2-карбоксамид; T-1106 – 3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил)-2-пиазинкарбоксамид; T-705 – 6-фтор-3-гидроксипиазин-2-карбоксамид; TSA – *n*-толуолсульфонамид; YFV – вирус желтой лихорадки.

## ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные заболевания, вызванные как новыми ранее не известными вирусами, так и периодически возвращающимися известными вирусами, в том числе новыми их вариантами, являются одной из главных причин высокой смертности, массовых эпидемий и пандемий. Ежегодно регистрируется появление трех-четырёх ранее неизвестных вирусов, опасных для человека [1]. Из-за свободного перемещения людей повышается опасность быстрого рас-

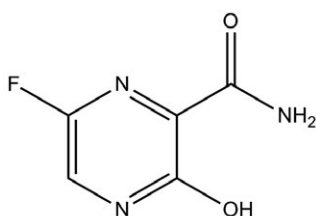
пространения вирусной инфекции среди населения. Кроме того, вирусы, опасные для человека, могут переноситься насекомыми или грызунами, прибывающими вместе с товарами. Кроме того, постоянно растущее взаимодействие человека с природой периодически приводит к появлению заболеваний, вызванных зоонозными вирусами, способными инфицировать человека, т.е. преодолевать видовой барьер, или новыми вариантами зоонозных вирусов, приобретших в результате генетической измен-

чивости способность заражать человека. К таким вирусам относятся вирус иммунодефицита человека, вирус гриппа (H1N1), высокопатогенный вирус птичьего гриппа (H5N1), вирус Хендра (ХеВ), вирусы Зика, денге и желтой лихорадки, вирус Эбола (EBOV), SARS-CoV-1 (вирус тяжелого острого респираторного синдрома) [2] и SARS-CoV-2 (COVID-19) [3]. Вирусы, которые могут не только инфицировать, но и эффективно передаваться от человека к человеку, способны вызывать серьезные вспышки заболеваний и/или эпидемии / пандемии [1].

Очевидно, что для борьбы с новыми и устойчивыми формами уже известных вирусных инфекций необходимо разрабатывать безопасные и высоко-селективные противовирусные соединения широкого спектра действия. С этой точки зрения особый интерес представляют синтетические аналоги природных нуклеозидов и нуклеотидов, поскольку они достаточно давно применяются для диагностики и лечения различных инфекционных заболеваний, а также обладают широкими биологическими и фармацевтическими возможностями [4, 5].

Фавипиравир (6-фтор-3-гидроксипирозин-2-карбоксамид, или Т-705) (**1**) (рис. 1) является синтетическим аналогом 1,4-пирозин-3-карбоксамид. Его активность против вируса гриппа А/PR/8/34(H1N1) обнаружена в исследовательской лаборатории Toyama Chemical Co., Ltd [6].

В дальнейшем было установлено, что фавипиравир проявляет селективную активность в отношении широкого круга неродственных РНК-содержащих вирусов, включая социально значимые и особо опасные, в том числе ортомиксовирусы (вирусы гриппа А, В и С), флави-вирусы (вирусы желтой лихорадки, Западного Нила, Зика), тогавирусы (вирусы Восточного, Западного, Венесуэльского энцефалитов лошадей, Чикунгунья), аренавирусы (вирусы лихорадки Ласса, Хунин), филовирусы (вирус Эбола), парамиксовирусы (респираторно-синцитиальный вирус и метапневмовирус человека), рабдо-



1

Рис. 1. Химическая структура фавипиравира (Т-705, 6-фтор-3-гидроксипирозин-2-карбоксамид)

вирусы (вирус бешенства) и другие, но не активен против ДНК-вирусов [7–10].

### ПРОТИВОГРИППОЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФАВИПИРАВИРА

Фавипиравир – эффективный ингибитор репродукции вирусов гриппа человека типов А, В и С, проявляет активность против штаммов, резистентных ко всем имеющим практическое значение противовирусным препаратам – ингибиторам нейраминидазы – осельтамивиру, занамивиру, ланинамивиру, пирамивиру; ингибиторам белка М2 – амантадину и ремантадину со значением минимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) в диапазоне от 0.014 до 0.55 мкг/мл [11–13], а также против вирусов свиней А/Н2N2, А/Н4N2, высокопатогенных вирусов птиц А/Н5N1 и новых вирусов А/Н7N9. Токсическое воздействие фавипиравира на культуру клеток MDCK незначительно, а показатель  $CC_{50}$  не был достигнут даже при его использовании в концентрации 2000 мкг/мл, что говорит о способности соединения высокоселективно ингибировать репликацию вирусов гриппа [12–15].

Высокая активность фавипиравира *in vivo* подтверждена на модели летальной гриппозной инфекции у мышей, которым препарат вводили перорально (табл. 1). Показано, что введение фавипиравира животным, инфицированным вирусом гриппа типа А, обеспечивает дозозависимое снижение титра вируса в легких и смертности животных. Терапевтическая эффективность фавипиравира варьирует в зависимости от подтипа и штамма вируса гриппа.

Важно, что защитный эффект фавипиравира не зависит от чувствительности вируса к осельтамивиру [14]. Потенцирующий эффект взаимодействия фавипиравира и осельтамивира показан на мышах, инфицированных подтипами вируса А/Н1N, А/Н3N2 и А/Н5N1 [16, 17]. Кроме того, что комбинация фавипиравира и осельтамивира эффективна также против инфекции, вызванной высокорезистентным к осельтамивиру штаммом вируса гриппа А/Mississippi/03/2001 (H1N1) H274Y. В этом случае осельтамивир оказался не эффективным даже при использовании в дозе 100 мг/кг/день (введение 2 раза в день в течение 5 дней). При одновременном введении осельтамивира (50 мг/кг/день) и фавипиравира (12.5 мг/кг/день) в дозах, которые по отдельности не вызывали защитного эффекта (100% смертность), выживали все животные [18].

Показан также взаимоусиливающий эффект фавипиравира и другого ингибитора нейраминидазы вируса гриппа – пирамивира, в опытах на мышах, инфицированных пандемическим вирусом гриппа А/California/04/2009 (H1N1) [19].

**Таблица 1.** *In vivo* активность фавипиравира против некоторых штаммов вируса гриппа при пероральном введении

Штамм вируса гриппа	Активность
A/Victoria/3/75 (H3N2)	Введение фавипиравира (30 и 100 мг/кг/день, 4 раза в день в течение 5 дней) обеспечивает 70 и 100% выживаемость мышей (при 100% гибели животных в контрольной группе). Вирусная нагрузка в легких мышей через сутки после начала лечения (100 мг/кг/день 4 раза в день) снижается более чем на 1 lg ТЦИД <sub>50</sub> /г. В группе, получавшей осельтамивир (20 мг/кг/день, 2 раза в день в течение 5 дней), выживаемость составила 50%, а снижение титра вируса в легких – 0.1–0.2 lg [11]
A/Duck/MN/1525/81(H5N1)	В условиях 100% гибели в контрольной группе введение фавипиравира (30 мг/кг/день, 4 раза в день в течение 5 дней) обеспечивает 100% выживаемость мышей, а осельтамивира (20 мг/кг/день, 2 раза в день в течение 5 дней) – 20% выживаемость мышей. 100% защитный эффект фавипиравира в дозе 300 мг/кг/день полностью сохраняется при отсрочке начала лечения на 36 ч и снижается до 90% при отсрочке на 48–72 ч [11]
A/ PR/8/34 (H1N1)	Повышение выживаемости мышей с 21.4 до 87.5% по сравнению с контрольной не леченной группой, снижение титра вируса в легких на 3 lg БОЕ/легкое (100 мг/кг/день по схеме 4 раза в день в течение 5 дней); предотвращение гибели мышей достигалось при увеличении разовой дозы (200 мг/кг/день), у 80% мышей титры вируса в легких были ниже предела обнаружения [6]
A/Vietnam/UT3040/04 (VN3040) (H5N1) высокопатогенный для мышей	Смертность в контрольной группе – 100%. Введение фавипиравира (300 мг/кг/день, 2 раза в день) обеспечивало 50 и 100% выживаемость при 5- и 8-дневном курсе соответственно. При 8-дневном курсе инфекция протекала бессимптомно, а эффективность защиты животных сохранялась даже при отложенном на 72 ч первом введении препарата. При снижении дозы фавипиравира до 100 мг/кг/день (8-дневный курс) выживаемость животных снижалась до 90%, а при отложенном старте на 48 и 72 ч – до 60 и 25%. При введении фавипиравира купируется развитие трахеита и бронхита, дозозависимым образом снижается выработка провоспалительных цитокинов и площадь пораженных участков легких, существенно снижается инфекционный титр вируса в легких и мозге [14]
VN1203-H274Y – высокопатогенный для мышей вариант вируса A/Vietnam/UT3040/04 (VN3040), резистентный к осельтамивиру	Введение фавипиравира мышам (100 и 300 мг/кг/день 2 раза в день) в течение 8 дней обеспечивало выживаемость 50 и 100% животных соответственно, при 100% гибели животных в контроле [14]

### МЕХАНИЗМ АНТИВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ ФАВИПИРАВИРА

Механизм действия фавипиравира досконально изучен на примере вируса гриппа. Так показано, что действие фавипиравира направлено на РНК-зависимую РНК-полимеразу (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) вируса гриппа типа А, компонентами которой являются кодируемые вирусом белки PB1, PB2, PA. Биологической активностью обладает метаболит фавипиравира – фавипиравир-4-рибофуранозил-5'-трифосфат (Т-705-РТР). Во внутриклеточной трансформации фавипиравира с образованием активного метаболита участвуют только клеточные ферменты. Фавипиравир сначала превращается HGPRT в рибозо-5'-монофосфат (Т-705-RMP), а затем клеточными киназами метаболизируется до трифосфатной формы [20, 21]. Т-705-РТР распознается вирусной RdRp, эффективно конкурируя с природными субстратами GTP и в меньшей степени АТФ, и включается в растущую цепь РНК [11, 14, 22], а также ингибирует активность RdRp, что приводит к тоталь-

ной супрессии вирусспецифического синтеза РНК (транскрипции и репликации вирусного генома). Схема метаболических превращений фавипиравира приведена на рис. 2 [20]. Важно подчеркнуть, что на синтез ДНК и клеточных РНК фавипиравир не оказывает существенного влияния, что объясняется отсутствием супрессирующего эффекта Т-705 в отношении клеточных ДНК-полимераз ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ) и ДНК-зависимой РНК-полимеразы II [11].

До недавнего времени было опубликовано только два сообщения о небольшом снижении противовирусного действия Т-705 в отношении вирусов гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1 (в 1.8 и 1.5 раза) с мутацией V43I в полимеразной субъединице PB1 (одного из белков, формирующих рибонуклеопротеин) [23, 24].

Goldhill D. и соавт. удалось получить вариант вируса гриппа А/Н1N1, глубоко резистентного к фавипиравиму (чувствительность вируса снижена в 30 раз) [25]. Снижение чувствительности обусловлено комбинацией двух мутаций в RdRp – K229R в субъединице PB1 и P653L в PA. Замена K229R вызывает резистентность к фавипиравиму, но кри-

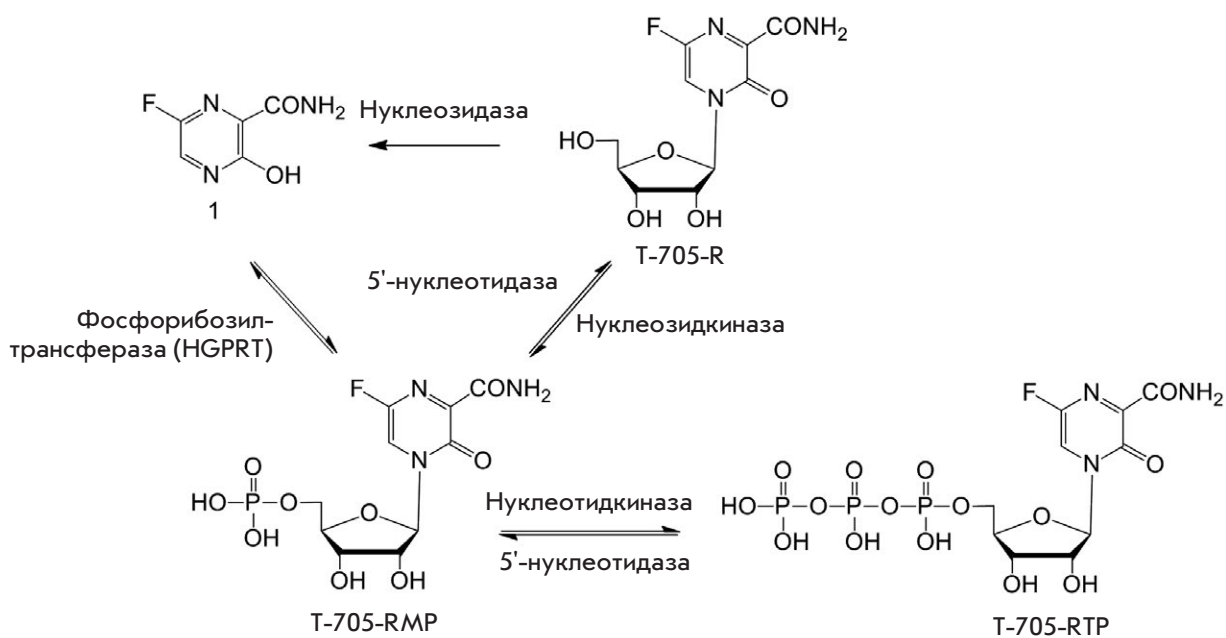


Рис. 2. Схема образования активной формы фавипиравира

тически (в 30 раз) снижает активность RdRp и эффективность репродукции вируса. Замена P653L в субъединице PA носит компенсаторный характер и восстанавливает полимеразную активность, ассоциированную с PB1, без снижения уровня резистентности и нормализует кинетику репродукции мутантного варианта вируса. Роль комбинации мутаций K229R + P653L в формировании резистентности к фавипиравиру подтверждена еще на двух подтипах вируса гриппа А (H3N2 и H7N9). Интересно, что при введении замены K229R в PB1 или комбинации замен PB1/K229R+PA/P653L мутагенный эффект фавипиравира снижается, т.е. повышается точность воспроизведения вирусного генома RdRp: продуцируемая РНК содержит существенно меньше мутаций даже в присутствии Т-705 в высокой концентрации 100 мкМ по сравнению с RdRp дикого типа, также снижается включение Т-705 в растущую вирусную РНК во время репликации *in vitro* [25].

Противовирусное действие фавипиравира против большого числа РНК-вирусов частично можно объяснить его способностью после превращения в Т-705-RTP встраиваться в синтезируемую вирусную РНК и связываться с консервативными доменами RdRp, тем самым ингибируя процесс репликации вируса. Так, при использовании других вирусных моделей с РНК-позитивным геномом получены варианты вирусов, резистентные к фавипиравиру, и установлен молекулярный механизм лекарственной резистентности. Ключевая мутация

K291R у вируса Чикунгунья (тогавирус) локализовалась в nsP4 (RdRp) и, как мутация K229R вируса гриппа, находилась в высококонсервативном мотиве F nsP4, обладающего активностью РНК-полимеразы [26]. Подобная мутация K159R в мотиве F в 3D (RdRp) вируса Коксаки В3 (пикорнавирус), полученная генно-инженерным способом, фатально снизила активность очищенной вирусной RdRp и оказалась летальной. Как и в случае вируса гриппа, для восстановления жизнеспособности соответствующего мутантного вируса потребовалась компенсаторная мутация A239G в RdRp [27].

С другой стороны, ряд исследователей считает, что для прекращения элонгации РНК необходимо по меньшей мере два последовательных включения Т-705-RMP. Следовательно, при высоких концентрациях фавипиравира основным механизмом ингибирования репродукции вируса может быть терминация синтеза РНК, тогда как при низких концентрациях соединения – способность индуцировать летальный мутагенез [28]. Это было показано в опытах с вирусами гриппа типа А (H1N1) [17, 29], гепатита С [30], Западного Нила [31], денге [32] и Эбола [33].

Механизм летального мутагенеза объясняется концепцией пороговой ошибки, в соответствии с которой превышение порогового значения количества мутаций в процессе репликации генома равносильно потере наследственной информации [34]. Большинство РНК-содержащих вирусов характеризуется высокой скоростью возникновения



мутаций из-за отсутствия механизма, корректирующего ошибки в процессе репликации вирусного генома [35]. Гипермутабельность способствует быстрой адаптации вирусов к тем или иным неблагоприятным изменениям окружающей среды, например, позволяет быстро развивать устойчивость к противовирусным препаратам. Однако в присутствии гипермутатора в процессе копирования вирусного генома скорость мутагенеза превышает пороговый уровень, синтезируются дефектные геномы, что приводит к образованию нежизнеспособных вирусных частиц. Фенотипически это выражается в значительном снижении инфекционности новой генерации вируса (отношения титра инфекционных вирусных частиц к числу копий вирусного генома) [36].

Так, в опытах *in vitro* установлено, что в присутствии фавипиравира снижение количества инфекционных частиц вируса гриппа А/Н1N1 не коррелирует с уменьшением количества копий РНК (вирусных геномов), что указывает на сохранение активности транскрипционного комплекса и увеличение содержания (%) дефектных вирусных частиц в популяции. Анализ последовательности гена *NP* показал дозозависимое увеличение частоты мутаций, главным образом транзиций (G→A и C→U), и сдвиг нуклеотидных профилей отдельных клонов [29]. Явление гипервариабельности вируса гриппа А/Н5N1 наблюдали также в опытах *in vivo* при инфекции у мышей, получавших фавипиравир, по сравнению с контрольной группой и мышами, лечеными осельтамивиром [17].

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФАВИПИРАВИРА ПРОТИВ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2

В 2014 г. под торговым названием Авиган® фавипиравир был разрешен в Японии для лечения новых или возвращающихся пандемических инфекций вируса гриппа, хотя его использование должно ограничиваться случаями, когда лицензированные противогриппозные препараты неэффективны или недостаточно эффективны (<http://www.toyama-chemical.co.jp/eng/news/news140324e.html>) [37].

После вспышки в Китае в конце декабря 2019 г. эпидемии, вызванной новым типом коронавируса SARS-CoV-2, и ее быстрого распространения по всему миру в качестве возможных терапевтических средств для лечения пациентов с COVID-19 были протестированы десятки известных фармпрепаратов, обладающих антивирусным действием [38–40], в том числе и фавипиравир [3, 41].

*In vitro* SARS-CoV-2 оказался существенно менее чувствительным к фавипиравиму, чем вирус гриппа. Активность фавипиравира против клинического

изолята nCoV-2019BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019 проявлялась при его использовании в концентрации 61.88 мкМ ( $EC_{50}$ ), максимальная исследованная концентрация 400 мкМ была нетоксичной для культуры клеток Vero E6 ( $CC_{50} > 400$  мкМ, индекс селективности  $SI > 6.46$ ) [42]. В другом исследовании фавипиравир оказался неэффективным против клинического изолята SARS-CoV-2, BetaCoV/HongKong/VM20001061/2020, даже при использовании в концентрации 100 мкМ [43].

Важно, что изучение влияния фавипиравира на животных в дозах, эквивалентных предлагаемым схемам лечения людей, выявило эмбриотоксичность препарата: у крыс наблюдалась гибель плода на ранних стадиях эмбриогенеза, а также снижение массы тела живого плода и количества живых плодов, снижение выживаемости помета через 4 дня после рождения и снижение прироста массы тела. Кроме того, фавипиравир проявил тератогенность в опытах на мышах, крысах, кроликах и обезьянах [3]. Учитывая высокий риск тератогенности и эмбриотоксичности фавипиравира, ни одно клиническое исследование на людях не включало беременных или кормящих женщин, а от участников испытаний требовалось исключить незащищенные половые контакты во время проведения испытаний и в течение 90 дней с момента приема последней дозы препарата. Поэтому риски для человека остаются неизвестными, а применение фавипиравира находится под строгим контролем, ограничивающим его использование особенно беременными женщинами [10].

Известно также, что рибозо-5'-трифосфатная форма фавипиравира является субстратом для митохондриальной РНК-полимеразы человека [44]. *In vitro* показано, что включение T-705-RTP в митохондриальную РНК не оказывает токсического действия на митохондрии человека, т.е. не приводит к обрыву цепи или ингибированию активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Тем не менее, необходимо с осторожностью применять фавипиравир, поскольку возможно его опосредованное токсическое воздействие на митохондрии [44].

На сайте Clinicaltrials.gov по состоянию на 27 ноября 2020 г. [Accessed 2021 Nov 27 Available at <http://www.clinicaltrials.gov>] зарегистрировано 47 клинических исследований эффективности фавипиравира в качестве средства для лечения COVID-19 (из которых 17 завершены). В протоколах испытаний фавипиравира при COVID-19 у взрослых обычно указывается следующая дозировка: в 1-й день ударная доза 1600 или 1800 мг 2 раза в день, затем поддерживающая суточная доза – 1200–2000 мг в 2, 3 или 4 приема в течение следующих 4–13 дней.

Результаты ряда клинических испытаний фавипиравира при COVID-19 указывают на критические факторы, влияющие на исход лечения, такие, как использование ударных доз <45 мг/кг в день, старший возраст, исходная тяжесть заболевания.

Приведем результаты нескольких клинических испытаний, проведенных в Китае и Российской Федерации.

Открытое рандомизированное многоцентровое исследование с участием 236 взрослых с пневмонией COVID-19 в средней, тяжелой или критической форме проведено в Китае (ChiCTR2000030254): 116 пациентов получали фавипиравир (1-й день 1600 мг перорально 2 раза, затем 600 мг перорально 2 раза в день в течение 7–10 дней), а 120 – умифеновир (Арбидол®; 200 мг 3 раза в сутки в течение 7–10 дней). Скорость клинического выздоровления на 7-й день у пациентов с пневмонией COVID-19 средней степени тяжести составила 61% (71/116) в группе фавипиравира против 52% (62/120) в группе умифеновира; у пациентов с тяжелой или критической COVID-19 – 16% против 0% соответственно. В группе фавипиравира быстрее достигалось снижение температуры и прекращение кашля [45].

С 30 января по 14 февраля 2020 г. в Третьей народной больнице Шэньчжэня (Шэньчжэнь, Китай) проведено открытое контролируемое исследование эффективности лечения COVID-19 с помощью фавипиравира (зарегистрировано в Китайском реестре клинических испытаний (ID: ChiCTR2000029600) [46]. В исследование были включены пациенты в возрасте от 16 до 75 лет с лабораторно подтвержденным диагнозом коронавирусной инфекции с клиническими проявлениями заболевания не более 7 дней (N = 35). Пациенты, которые изначально получали противовирусную терапию лопинавиром/ритонавиром до 30 января 2020 г., были включены в контрольную группу (N = 45). Все исходные характеристики клинического состояния пациентов в группах были сопоставимыми. Фавипиравир использовали перорально по схеме (1-й день по 1600 мг 2 раза в день; затем со 2-го по 14-й дни – 600 мг 2 раза в день +  $\alpha$ -интерферон (5 млн МЕ дважды ежедневно в виде аэрозольной ингаляции)). Пациенты контрольной группы получали лопинавир/ритонавир (14 дней по 400 мг/100 мг 2 раза в день +  $\alpha$ -интерферон (5 млн МЕ дважды ежедневно в виде аэрозольной ингаляции)). В группе пациентов, получавших фавипиравир, среднее время клиренса вируса (4 дня) было короче, чем в контрольной группе (11 дней), установлено также значительное улучшение КТ-картины грудной клетки по сравнению с контрольной группой со степенью улучшения 91% по сравнению с 62% в контрольной группе. В этом

исследовании фавипиравир показал лучший терапевтический эффект, оцениваемый по прогрессированию COVID-19 и выведению вируса.

В Российской Федерации при проведении промежуточного пилотного этапа открытого, рандомизированного, многоцентрового клинического исследования фазы II/III сравнительной эффективности препарата «Авифавир» (фавипиравир) и стандартного лечения (SOC) с участием 60 госпитализированных взрослых пациентов (в возрасте 60 лет и старше) с умеренной пневмонией COVID-19 (Россия, NCT04434248) использовали следующие режимы дозирования: фавипиравир перорально по 1600 мг 2 раза в день в 1-й день, затем по 600 мг 2 раза в день на 2–14 дни (группа 1, N = 20) или по 1800 мг дважды в 1-й день, затем по 800 мг 2 раза в день на дни 2–14 (группа 2, N = 20). В группе 3 (SOC, контроль) 15 пациентам вводили гидроксихлорохин или хлорохин, одному – лопинавир/ритонавир, а четыре пациента не получали этиотропного лечения [47]. Вирусологический ответ в группах 1 и 2: фавипиравир обеспечил выведение вируса SARS-CoV-2 в течение 4 дней у 25/40 (63%) пациентов, к 10-му дню у 37/40 (93%) пациентов. Аналогичные показатели в группе 3 (SOC) составили 6/20 (30%) и 16/20 (80%) соответственно. Среднее время до нормализации температуры тела (<37°C) в группах 1 и 2 составило 2 и 4 дня в группе SOC. К 15-му дню результаты КТ грудной клетки улучшились у 90% (36/40) пациентов, получавших фавипиравир, против 80% (16/20) у пациентов, получавших SOC. Неблагоприятные лекарственные реакции на фавипиравир (диарея, тошнота, рвота, боль в груди и повышение уровня печеночных трансаминаз) от легкой до умеренной степени зарегистрированы у 7/40 (18%) пациентов, у 2/40 (5%) пациентов они привели к преждевременному прекращению приема исследуемого препарата. Таким образом, фавипиравир вводили в среднем в течение  $10.9 \pm 2.8$  дней.

С 21 мая по 10 августа 2020 г. в Российской Федерации проведено открытое, рандомизированное, многоцентровое исследование 3-й фазы [48] с целью оценки эффективности и безопасности фавипиравира в виде таблетированной лекарственной формы (Арепливир, ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) по сравнению со Стандартом медицинской помощи у пациентов, госпитализированных с умеренной пневмонией COVID-19 (Идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT04542694). Исследования проводили в четырех медицинских учреждениях: Государственная клиническая больница № 50 (г. Москва), Областная клиническая больница (г. Рязань), Городская больница № 40 Курортного района (г. Санкт-Петербург), Смоленская клиническая больница № 1 (г. Смоленск).

Двести пациентов в возрасте от 18 до 80 лет с установленным диагнозом «коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2, средней степени тяжести» рандомизированы в соотношении 1:1. Пациенты группы 1 в 1-й день терапии дважды получили по 1600 мг фавипиравира (восемь таблеток одновременно, всего 16 таблеток за сутки), а затем со 2-го по 14-й день по 600 мг (три таблетки) 2 раза в сутки (шесть таблеток в сутки). Пациенты группы 2 получали стандартную терапию, но не фавипиравир (гидроксихлорохин с азитромицином или без него, хлорохин, лопинавир/ритонавир или другие рекомендуемые схемы). Скорость улучшения клинического статуса пациентов к 10-му дню по категориальной порядковой шкале улучшения клинического статуса ВОЗ составила 27% (группа 1) и 15% (группа 2). Скорость выведения вируса к 10-му дню – процент пациентов с элиминацией COVID-19 по данным ПЦР – составила 98% (группа 1) и 79% (группа 2). Изменение степени повреждения легких по данным КТ (уменьшение объема очага) в сравнении с исходным уровнем – 60% (группа 1) и 40% (группа 2). Смертность в обеих группах – 0%. При проведении лечения в обеих группах (200 пациентов) не возникло необходимости в переводе пациентов в отделение интенсивной терапии, в использовании неинвазивной вентиляции легких или механической вентиляции (ИВЛ).

Несмотря на имеющиеся побочные действия, эффективность и широкий спектр противовирусного действия фавипиравира делают его перспективным противовирусным соединением.

Полученные результаты послужили основанием для получения фавипиравиром одобрения для лечения коронавирусной инфекции (COVID-19) в ряде стран, в том числе в Китае [49] и Индии [50].

В Российской Федерации фавипиравир с 2020 г. используется в качестве этиотропного препарата при коронавирусной инфекции (COVID-19) с легким и среднетяжелым течением [51, 52], он также включен в «Перечень жизненно необходимых и важней-

ших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2021 год» [53] (<https://mine-med.ru/archive/p2021p1.pdf>). Выпускается в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой под торговыми названиями АВИФАВИР (ООО «Хромис»), Арепливир (ООО «ПРОМОМЕД РУС»), ФАВИПИРАВИР (АО «АЛИУМ»), КОВИДОЛЕК (ООО «Нанолек»), Фавибирин (АО «Фармасинтез»), КОРОНАВИР (ООО «Технология лекарств») [54]. Кроме того, в 2021 г. первый отечественный препарат для внутривенного введения (Арепливир, ООО «ПРОМОМЕД РУС») получил регистрационное удостоверение Минздрава России [55].

В настоящее время проходят исследования антивирусной активности структурных аналогов фавипиравира. Это особенно важно в тех условиях, когда против многих заболеваний, вызванных РНК-вирусами, нет одобренных противовирусных препаратов или эффективных вакцин, а большая часть мероприятий направлена лишь на поддерживающее лечение заболевших.

### СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ ФАВИПИРАВИРА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИВИРУСНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Среди структурных аналогов фавипиравира можно выделить следующие соединения (рис. 3):

Особый интерес представляют Т-1105 (4) и Т-1106 (5), синтезированные исследовательской лабораторией Toyama Chemical Co., Ltd. Противовирусная активность этих аналогов против вируса гриппа А/PR/8/34(H1N1) обнаружена в 2009 г. при скрининге химической библиотеки соединений *in vitro* [7].

Как и фавипиравир, Т-1105 ингибирует RdRp вируса в виде активной формы нуклеозид-5'-трифосфата (Т-1105-РТФ). Известно, что по сравнению с фавипиравиром эффективность активации *in vitro* 3-гидроксипирозин-2-карбоксамид до его рибозо-5'-трифосфатной формы в большей степени зависит от клеточной линии, в которой происходит эта активация. Так Т-1105 показал более высокую противовирусную активность в клетках MDCK

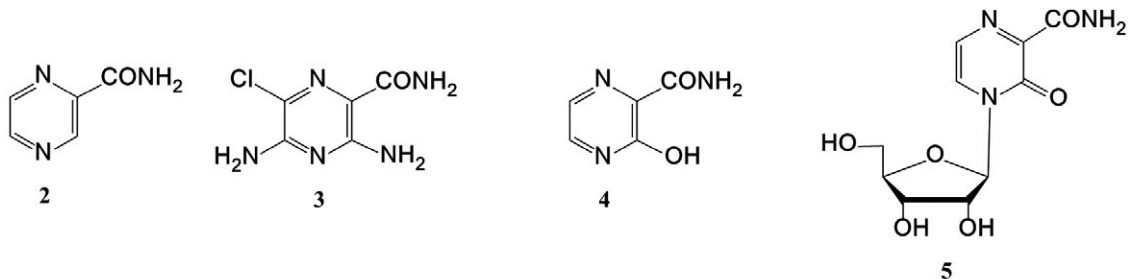


Рис. 3. Некоторые структурные аналоги фавипиравира: 2 – 2-пирозинкарбоксамид; 3 – 3,5-диамино-6-хлор-2-пирозинкарбоксамид; 4 – 3-гидроксипирозин-2-карбоксамид (Т-1105); 5 – 3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил)-2-пирозинкарбоксамид (Т-1106)

(уровень T-1105-RTP составил 841 и 1228 пмоль/10<sup>6</sup> клеток через 24 ч инкубации с 0.5 и 1 мМ T-1105 соответственно). В контрольном опыте на этой клеточной линии при использовании фавипиравира в эквимольных концентрациях 0.5 и 1 мМ уровень T-705-RTP в 4 раза ниже, чем уровень T-1105-RTP. Противовирусная активность T-1105-RTP не обнаружена в клетках A549 и Vero (меньше 50 пмоль/10<sup>6</sup> клеток), а также в клетках HEK293T (65 и 171 пмоль/10<sup>6</sup> клеток через 24 ч инкубации с 0.5 и 1 мМ T-1105 соответственно). В трех последних клеточных линиях активацию T-1105 затрудняло неэффективное превращение T-1105-RMP в T-1105-RDP. Данное явление связывают с тем, что наряду с основным метаболическим путем идет параллельная реакция, в ходе которой T-1105-RMP превращается с помощью фермента NMNAT в метаболит T-1105-RAD (рис. 4) [56].

Поскольку T-705-RAD и T-1105-RAD обнаружены во всех описанных выше клеточных линиях, их изучают в качестве аналогов никотинамидадениндинуклеотида (NAD).

Обнаружена активность нефторированного аналога фавипиравира T-1105 против вируса CHIKV *in vitro*. T-1105 оказался селективным ингибитором цитопатогенного эффекта, индуцированного клиническими изолятами CHIKV, а также другими альфавирусами. Противовирусная активность T-1105 была в 2–5 раз выше, чем у фавипиравира. Например, для лабораторного штамма Indian Ocean 899 вируса CHIKV значение EC<sub>50</sub> у T-705 составило 25 ± 3 мкмоль/л, а у T-1105 – 7.0 ± 1 мкмоль/л [27].

В опытах с вирусом ящура *in vivo* T-1105 эффективно подавлял клинические признаки заболевания у инфицированных свиней, уменьшал виремию и выделение вируса (пероральная доза: 400 мг/кг/день в течение 6 дней). Также на модели морских свинок сравнивали эффективность 3-гидроксипиразин-2-карбоксамидов и профилактической вакцины O<sub>1</sub> Manisa против вируса ящура. Показано, что эффективность профилактической терапии T-1105 (морские свинки, перорально – 400 мг/кг/день в течение 5 дней) сравнима с эффективностью вакцинирования животных [57].

T-1106 оказался эффективнее, чем фавипиравир, против вируса желтой лихорадки (YFV) на модели сирийских хомячков с минимальной эффективной дозой 32 мг/кг/день при внутривенном или пероральном введении. T-1106 не продемонстрировал противовирусное действие в экспериментах по снижению цитопатогенного эффекта, индуцированного вирусом желтой лихорадки в клеточной линии Vero (EC<sub>50</sub> больше 100 мкг/мл) и CV-1 (EC<sub>50</sub> больше 369 мкмоль/л) [58, 59].

Фавипиравир был более эффективным, чем T-1106, при тестировании препаратов против ряда представителей рода Phlebovirus *in vitro*. В то же время эффективность T-1106 на модели сирийских хомячков, зараженных вирусом PTV, характерной особенностью которого является поражение печени, оказалась в 9.4 раза выше, чем у фавипиравира (на основании определения ED<sub>50</sub>). На мышинной модели лучшую противовирусную активность показал фавипиравир [60].

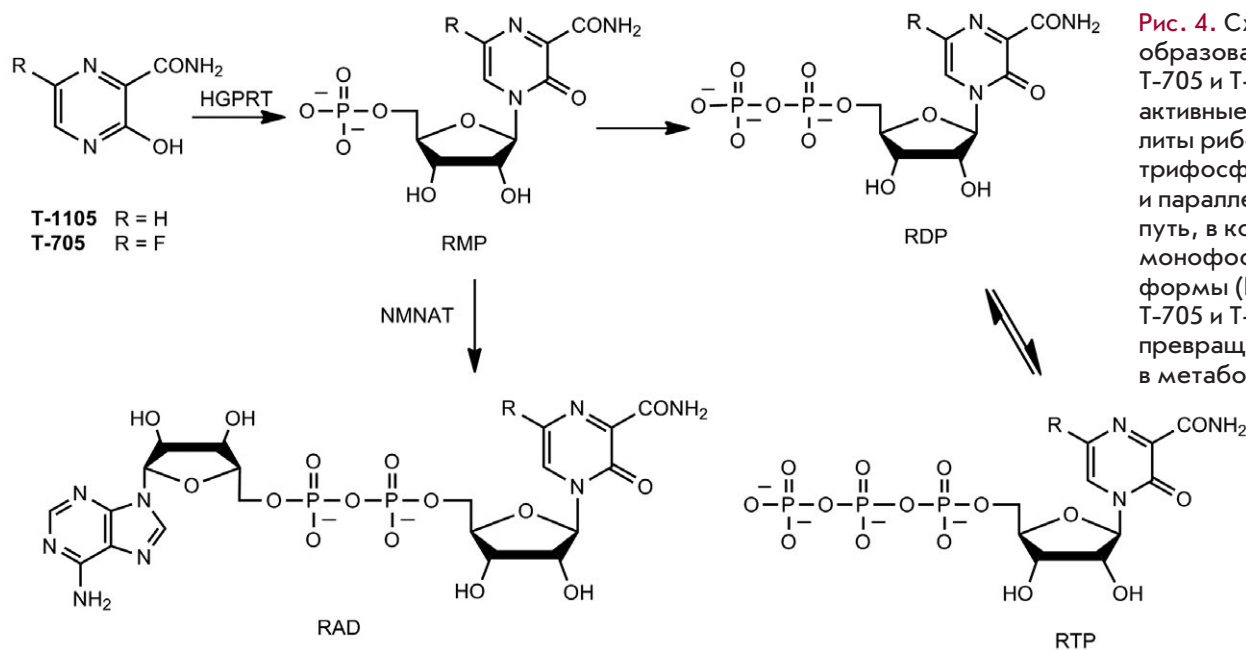


Рис. 4. Схема преобразования T-705 и T-1105 в их активные метаболиты рибозо-5'-трифосфаты (RTP) и параллельный путь, в котором монофосфатные формы (RMP) T-705 и T-1105 превращаются в метаболит RAD



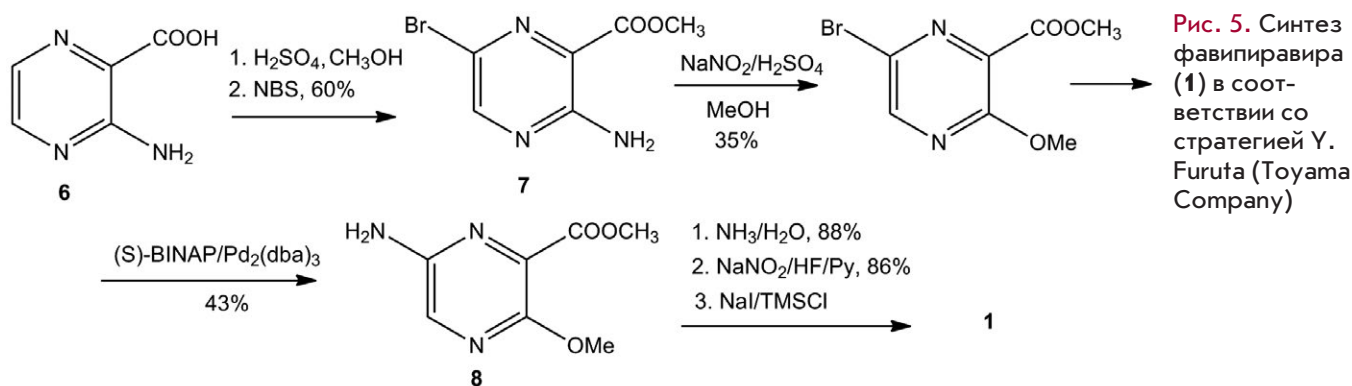


Рис. 5. Синтез фавипиравира (1) в соответствии со стратегией Y. Furuta (Toyama Company)

Проведено сравнение активности T-1105 и нуклеозида T-1106 против DENV *in vitro* [32]. Эффективность T-1105 была в 5 раз выше у фавипиравира ( $\text{EC}_{50} 21 \pm 0.7$  мкмоль/л и  $110 \pm 30$  соответственно). Почти во столько же раз она превосходила активность T-1106 ( $\text{EC}_{50} 113 \pm 11$  мкмоль/л). Кроме того, и T-1105, и его нуклеозид способны индуцировать летальный мутагенез генома вируса из-за неправильного спаривания оснований при формировании вторичной структуры РНК.

Очевидно, что высокая активность против РНК-вирусов присуща не только фавипиравису, но и его структурным аналогам. В ряде исследований T-1105 и T-1106 показали даже более высокую эффективность по сравнению с фавипирависом как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, что говорит о необходимости их клинического изучения с целью дальнейшего использования в качестве противовирусных препаратов.

### СИНТЕЗ ФАВИПИРАВИРА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Классические синтетические подходы к получению фавипиравира подробно описаны в трех недавно опубликованных обзорах Y. Titova [61], N. Al Vujug [62] и W. Hu [63].

Первый вариант синтеза фавипиравира запатентован и впоследствии опубликован Y. Furuta и соавт. из Toyama Chemical Company, Ltd. (рис. 5) [64]. Исходную 3-аминопиразин-2-карбоновую кислоту (6) этерифицировали, затем бромировали, получая аминокарбоксилат (7). Образование аминокризаина (8) с использованием дорогого катализатора  $\text{Pd}_2$ /дифенилфосфинодинафтила (BINAP) протекало с невысоким выходом 43%. Второй узкий момент этой технологии – использование специфичного реактива Олаха (HF/Py) для введения атома F в положение 6 основания. Совокупный выход фавипиравира не превышал 1%. Эту технологию очень сложно масштабировать.

Другой вариант синтеза фавипиравира предложен тем же коллективом авторов в 2001 г. (рис. 6) [65].

Исходным соединением в синтезе был доступный диэтиловый эфир аминмалоновой кислоты (9), который в две стадии переводили в 3-гидрокси-пиразин-2-карбоксамид (10). Последний в результате последовательных трансформаций функциональных групп превращали в фавипиравир (1). Общий выход продукта составил 17%.

Измененный вариант последнего синтеза фавипиравира разработан компанией Тоуама в содру-

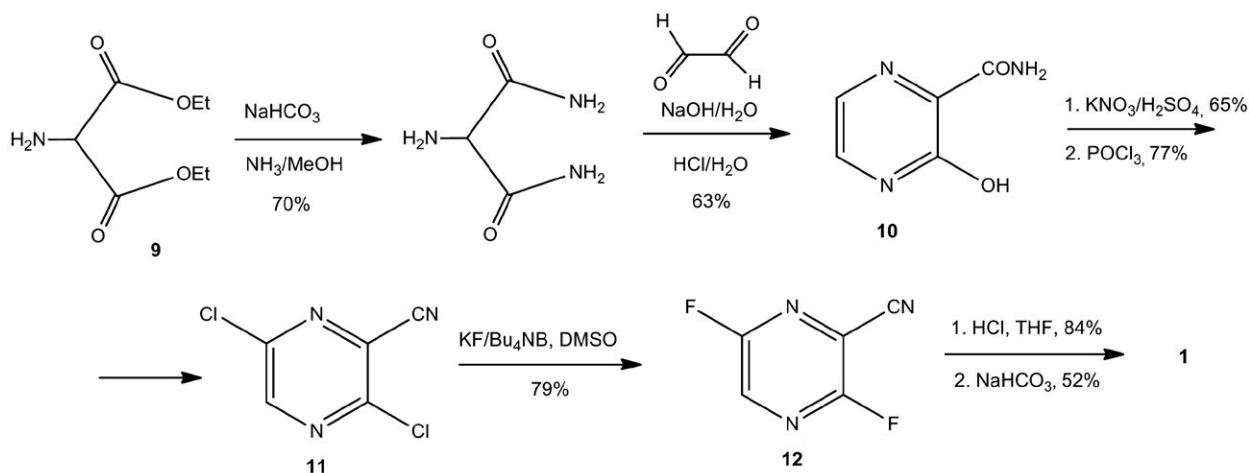
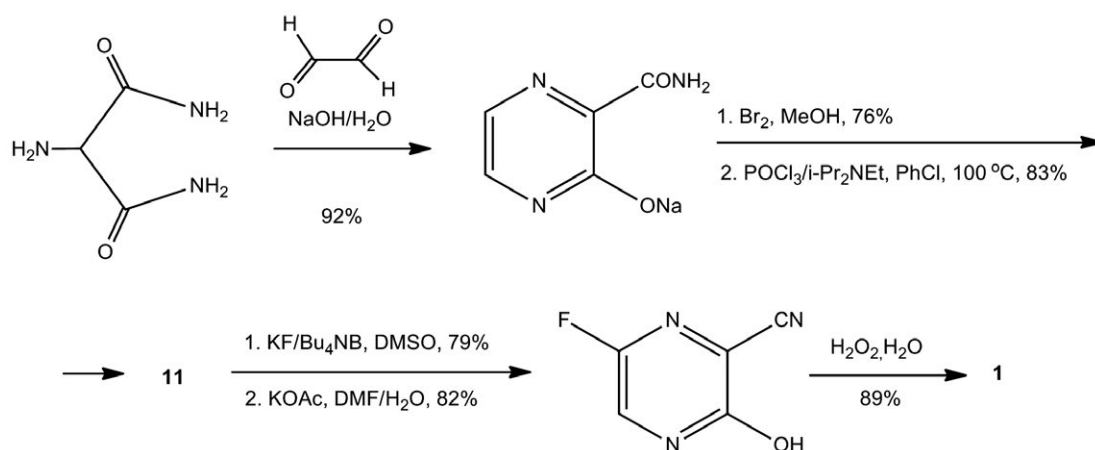
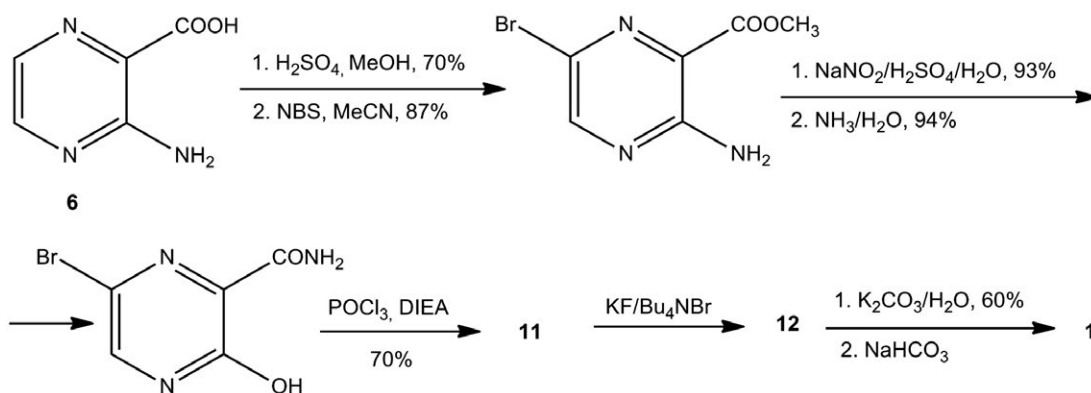


Рис. 6. Усовершенствованный синтез фавипиравира (1) в соответствии со стратегией Y. Furuta (Toyama Company)

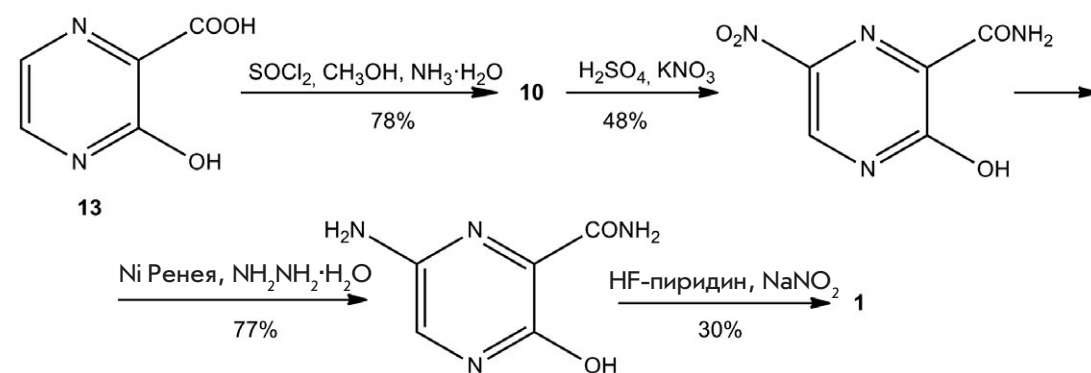
**Рис. 7.** Измененный вариант синтеза фавипиравира (**1**) в соответствии со стратегией Nippon Soda & Toyama Company 2011 г.



**Рис. 8.** Синтез фавипиравира (**1**) по методу Liu Feng



**Рис. 9.** Синтез 6-фтор-3-гидрокси-пирозин-2-карбоксамида (**1**) по способу Zhang и соавт.



жестве с корпорацией Nippon Soda [66, 67] (рис. 7). Этим способом удалось синтезировать фавипиравир с общим выходом 33%.

Четвертый вариант синтеза фавипиравира предложен Liu Feng и соавт. в 2017 г. [68] (рис. 8). Все промежуточные полупродукты очищали кристаллизацией, последнюю стадию проводили «one pot», фавипиравир (**1**) легко выделяется перекристаллизацией. Однако в синтезе используется большое количество хлорокси фосфора, которая представляет проблему при масштабировании процесса, выступая фактором загрязнения окружающей среды.

Кроме того, 3,6-дихлорпирозин-2-нитрил (**11**) является сильным аллергеном, вызывая раздражение

на коже. Из-за этих факторов технология Liu Feng не была масштабирована до промышленного получения фавипиравира.

Получение фавипиравира может быть осуществлено четырехстадийным способом, предложенным Zhang и соавт., из коммерчески доступной 3-гидрокси-пирозин-2-карбоновой кислоты (**13**) через этапы амидирования, нитрования, восстановления и фторирования (рис. 9) [69].

Еще один подход к синтезу фавипиравира предложен Xie и соавт. [70]. Этот подход и заключался в получении T-705 из недорогого и доступного 2-аминопирозина (**14**). Разработан синтез промежуточного соединения 3,6-дихлорпирозин-2-

Рис. 10. Синтез фавипиравира по методу Хие 2019 г.

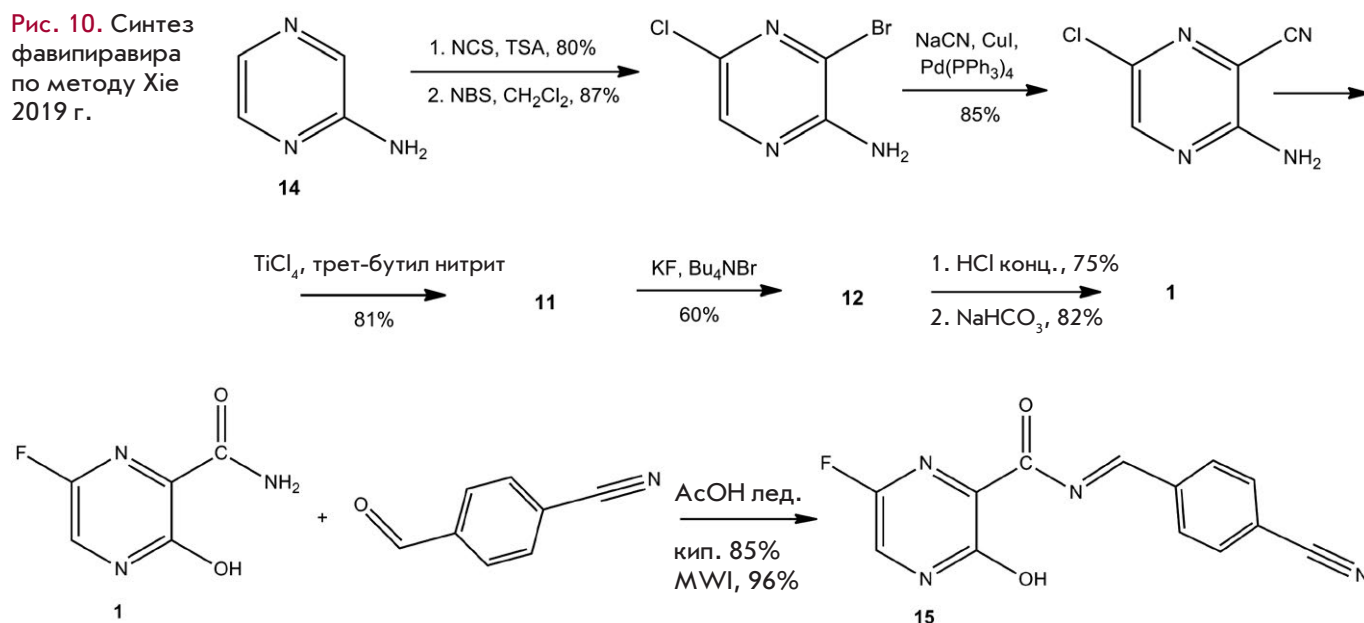


Рис. 11. Синтез 4-цианобензилиденового аналога фавипиравира (15) (MWI – инициация реакции с помощью микроволнового излучения)

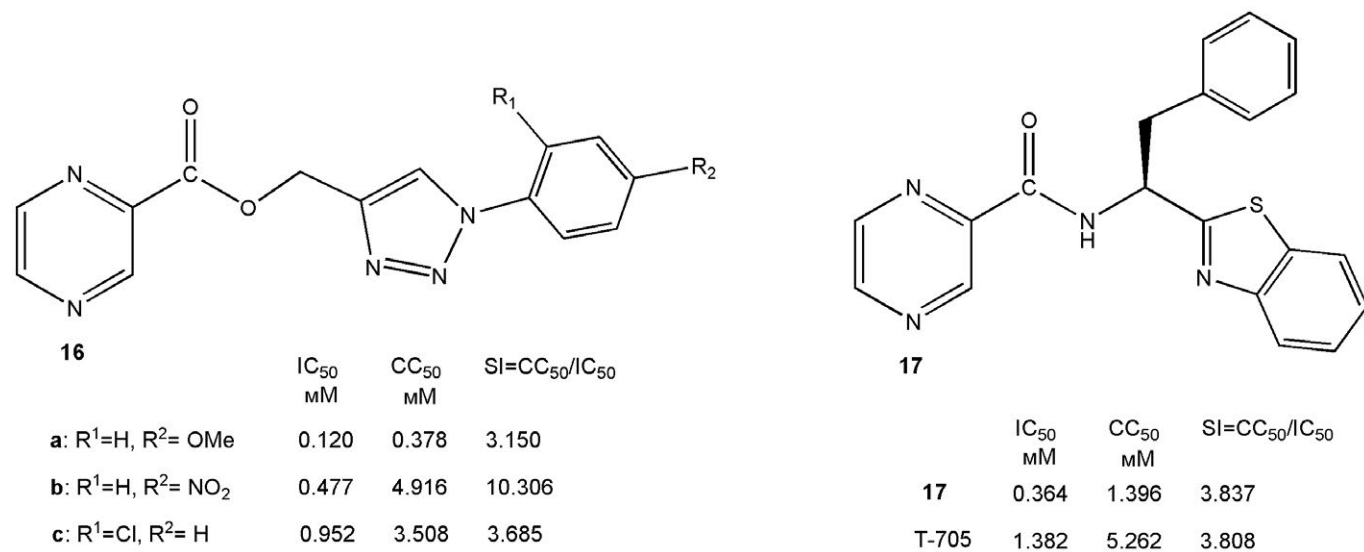


Рис. 12. Представители серии пиразин-триазольных (16) и бензотиазольный аналог (17) фавипиравира (15), обладающие противовирусной активностью в отношении SARS-CoV-2

карбонитрила (11) в четыре стадии, который не требует использования POCl<sub>3</sub> и обеспечивает хороший выход продукта (рис. 10).

В 2021 г. появилось сообщение о синтезе (E)-N-(4-цианобензилиден)-6-фтор-3-гидропиразин-2-карбоксамид ((15), Суаногона-20) [71] (рис. 11). Авторы утверждают, что это первый селективный ингибитор RdRp SARS-CoV-2 в 209 раз более эффективный, чем фавипиравир *in vitro* (EC<sub>50</sub> = 0.45 мкМ, EC<sub>50 (T-705)</sub> = 94.09 мкМ).

Предшествовавшие синтезу компьютерные расчеты предсказали, что соединение (15) может выступать в роли ингибитора RdRp SARS-CoV-2 через образование его рибозид-5'-трифосфата по механизму, описанному для фавипиравира. Кроме того, циано-группа является цинкофором, т.е. может быть переносчиком ионов цинка, снижая его внутриклеточную концентрацию. Тогда как Zn<sup>2+</sup> является кофактором RdRp SARS-CoV-2 и снижение его концентрации драматическим образом сказывается

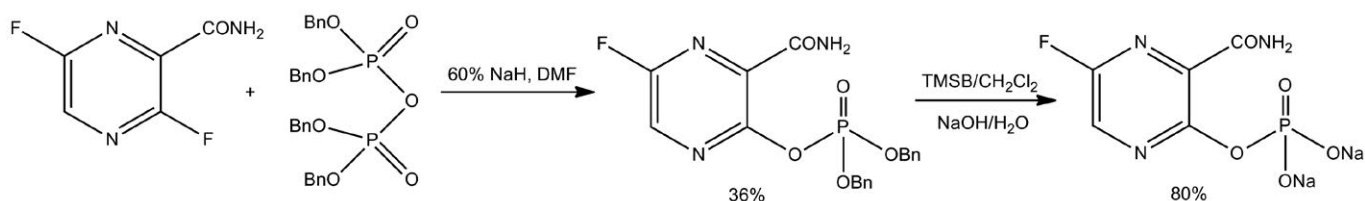


Рис. 13. Схема синтеза фосфата фавипиравира

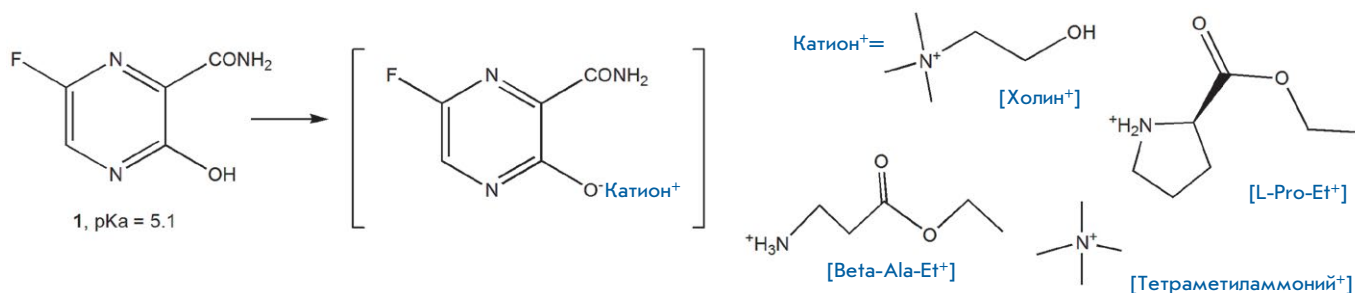


Рис. 14. Солевые формы фавипиравира (1)

ся на работе RdRp. Липофильный бензилиденный фрагмент Суаногона-20 способствует лучшему прохождению через цитоплазматическую мембрану клеток. Правда, данные по изменению растворимости основания (15) по сравнению с Т-705 в работе не приведены, только утверждается, что результаты изучения растворимости Суаногона-20 в воде были превосходными [71].

Проведены попытки синтеза новых аналогов 2-пиазинкарбоксамидов для усиления противовирусной активности в отношении SARS-CoV-2 [72]. Синтезирована серия из семи пиазин-триазольных (16) и 11 пиазин-бензотиазольных (17) гетероциклических оснований. На рис. 12 приведены аналоги, обладающие сравнимыми с фавипиравиром (1) или лучшими противовирусными свойствами.

Была предпринята попытка улучшить растворимость и биодоступность фавипиравира путем синтеза его фосфата (рис. 13) [73]. Однако данные по противовирусной активности полученных соединений отсутствуют.

Иной подход к улучшению растворимости фавипиравира использовала группа японских исследователей [74]: они попытались солюбилизировать плохо растворимый фавипиравир с использованием противоионов этиловых эфиров L-пролина (L-Pro-Et<sup>+</sup>) и бета-аланина (Beta-Ala-Et<sup>+</sup>), холина хлорида, тетраметиламмония гидрохлорида (рис. 14). Этот метод сейчас применяется в фармацевтике для получения сбалансированных различными противоионами плохо растворимых активных фармацевти-

ческих субстанций или белковых препаратов [75]. Стехиометрическое соотношение Т-705 и противоионов составляло 1:1 по данным ЯМР. Полученные солевые формы фавипиравира были аморфными (по данным рентгеноструктурного анализа) и обладали значительно лучшей растворимостью в водных растворах по сравнению с исходным кристаллическим фавипиравиром: наилучшей растворимостью характеризовался холиновый противоион (739 мг/мл для Cho-T-705 против 7.0 мг/мл для Т-705, рис. 14).

Все солевые формы фавипиравира обладали лучшими фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками, чем исходный фавипиравир в опытах *in vivo* [74].

Проведены попытки синтезировать на основе 3-оксопиазин-2-карбоксамидов эффективные препараты против вируса Зика [76] (рис. 15). 3-Гидроксипиазин-2-карбоксамид и фавипиравир проявили противовирусную активность в отношении вируса Зика на клеточной линии Vero. Т-1105 значительно снижал уровень гибели клеток со значением средней эффективной концентрацией (EC<sub>50</sub>), равной 97.5 ± 6.8 мкмоль/л.

При тестировании аналогов (18)–(20) наблюдали очень низкую (у соединений (18f–i) CC<sub>50</sub> 200–300 мкмоль/л) или отсутствующую (CC<sub>50</sub> >1000 мкмоль/л) противовирусную активность [76].

Wang и соавт. [77] синтезировали серию пиазидиновых, пиазидиновых и пиазидиновых С-нуклеозидов – аналогов фавипиравира (рис. 16).



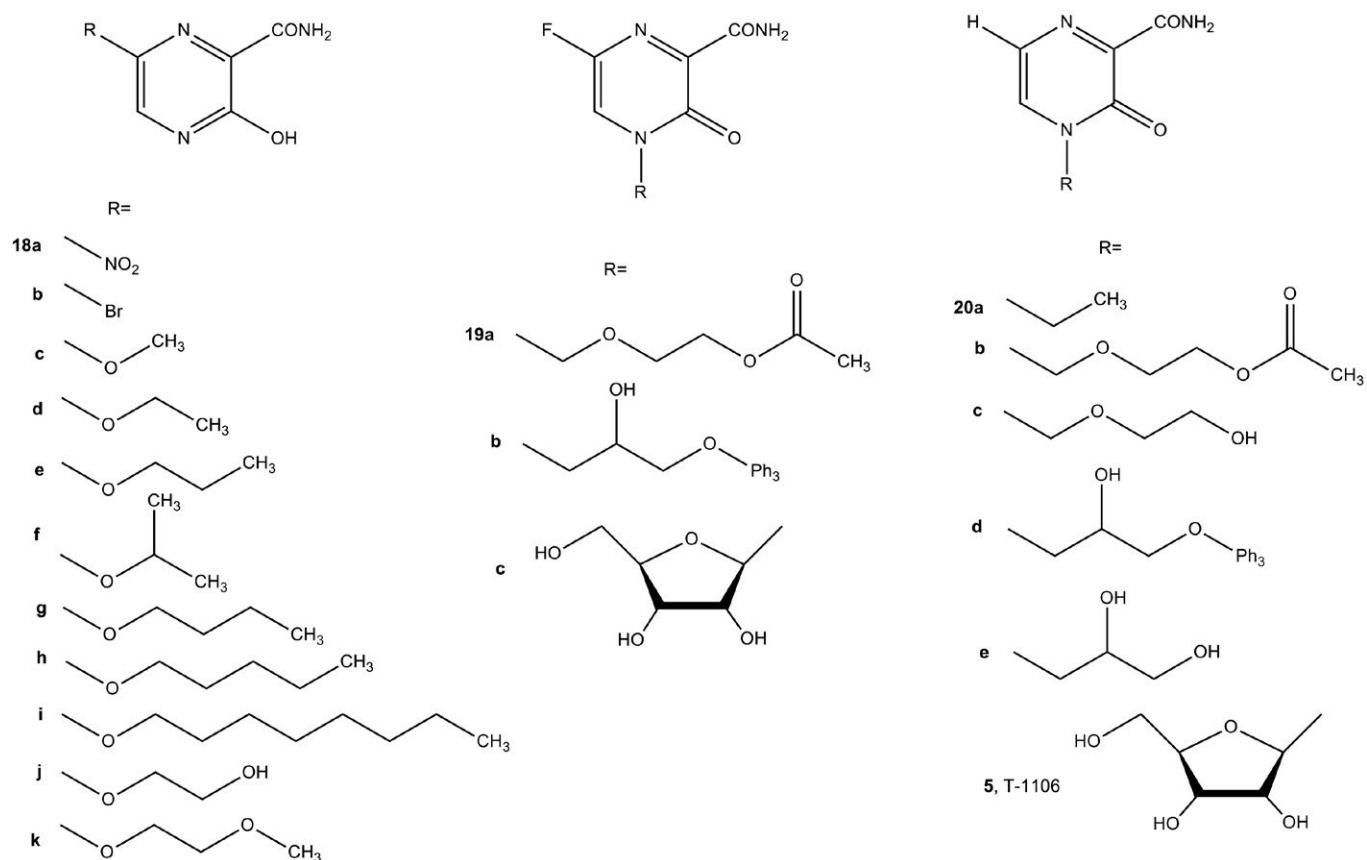


Рис. 15. Аналоги фавипиравира для изучения активности против вируса Зика

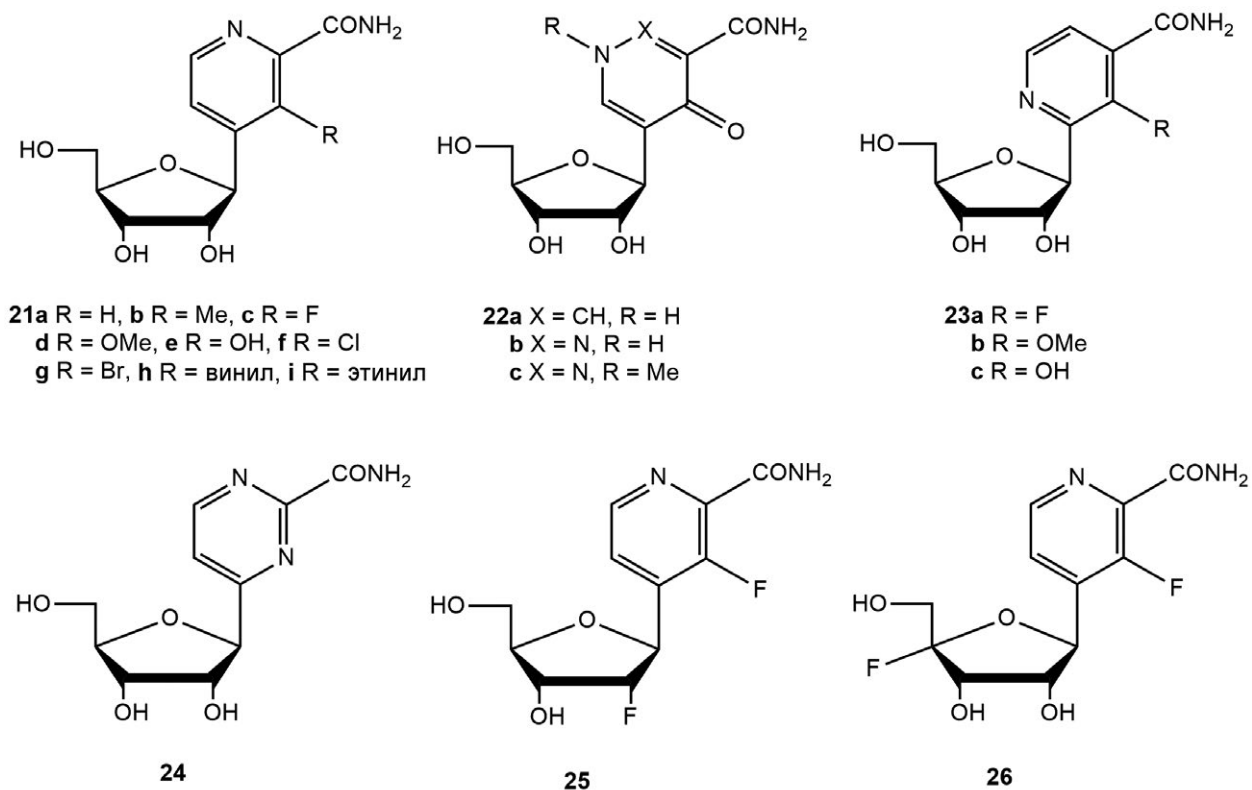


Рис. 16. С-нуклеозидные производные пиридина, пиридазина и пиримидина

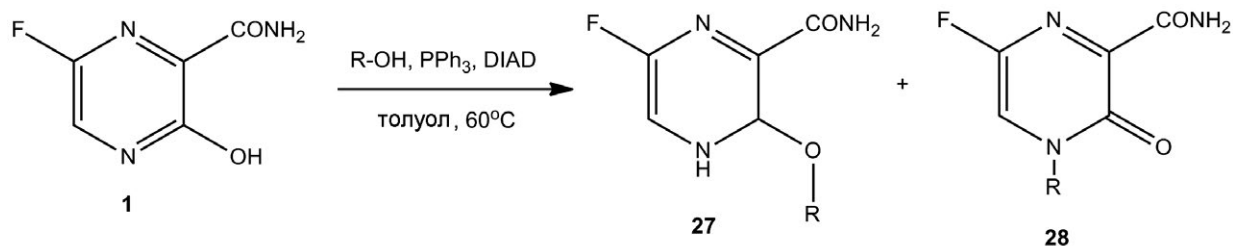


Рис. 17. Общая схема алкилирования фавипиравира в условиях реакции Мицунобу, R-OH – различные гидроксид-алкилфосфонаты

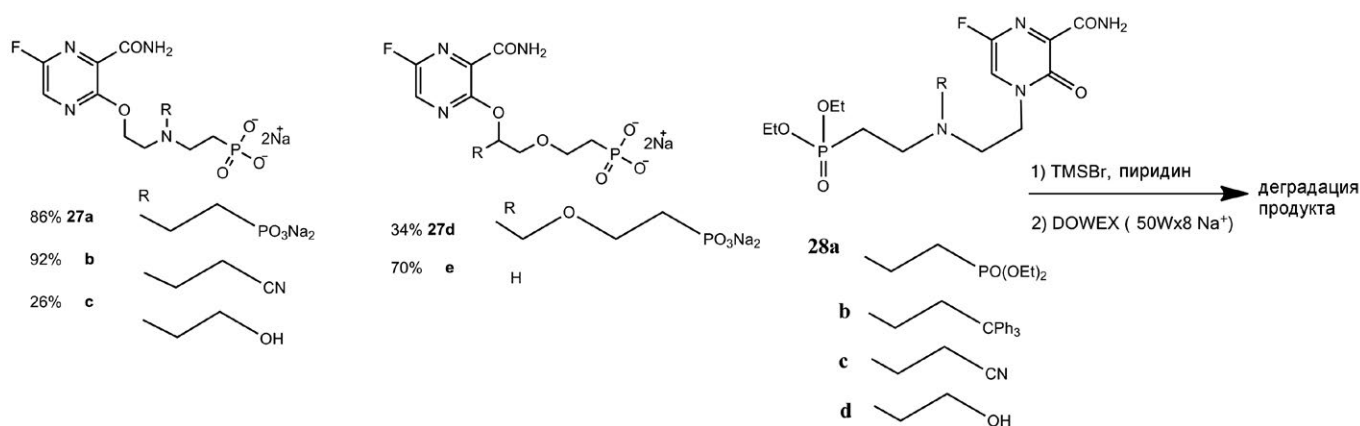


Рис. 18. Ациклические нуклеотидные производные фавипиравира

Изучена противовирусная активность всех соединений в клетках MDCK, инфицированных вирусом гриппа A/WSN/33 (H1N1). Самая высокая активность обнаружена у соединения (21e) со значением EC<sub>50</sub>, равным 1.3 мкмоль/л. В то же время данное вещество имело высокий показатель цитотоксичности: значение 50% цитотоксической концентрации (CC<sub>50</sub>) составило 2.0 мкмоль/л. Противовирусная активность соединения (21c) была сравнимой с T-705 – значение EC<sub>50</sub> составило 1.9 мкмоль/л, а значение CC<sub>50</sub> превысило 400 мкмоль/л. Остальные С-нуклеозиды проявили небольшую или слабую противовирусную активность, даже соединения (25) и (26) с модификацией по положению 2'-ОН и 4'-Н-группы рибозы имели невысокую активность [77].

Предложен синтез ациклических нуклеотидных аналогов фавипиравира в качестве возможных ингибиторов гипоксантингуанинксантин-фосфорибозилтрансферазы (HGXPRT) малярийного плазмодия *Plasmodium falciparum* [78]. HGXPRT катализирует магнийзависимый синтез нуклеозид-5'-монофосфатов из пуриновых оснований (гуанина или гипоксантина). Синтез ациклических нуклео-

тидных аналогов (27) и (28) проводили по реакции Мицунобу из фавипиравира. Алкилирование проходило в положения N<sup>4</sup> или O<sup>3</sup> гетероциклического кольца с образованием N- (28) или O-региоизомера (27) (рис. 17).

По схеме, представленной на рис. 18, получены O-алкилированные ациклические нуклеотидные производные фавипиравира (27). К сожалению, в условиях удаления защитных групп N-алкилированные производные T-705 оказались нестабильными.

Исследование O-алкилированных ациклических нуклеотидных производных фавипиравира в качестве ингибиторов HGXPRT и PfHGXPRT человека показало, что ни одно соединение не ингибировало ни один фермент в диапазоне концентраций от 100 до 150 мкмоль/л. Ациклические нуклеотидные производные гуанина или гипоксантина с теми же заместителями являются эффективными ингибиторами ферментов HGXPRT и PfHGXPRT со значением константы ингибирования в диапазоне от 0.07 до 5 мкмоль/л [78].

Синтез пролекарств на основе нуклеозидов является современным подходом к получению но-

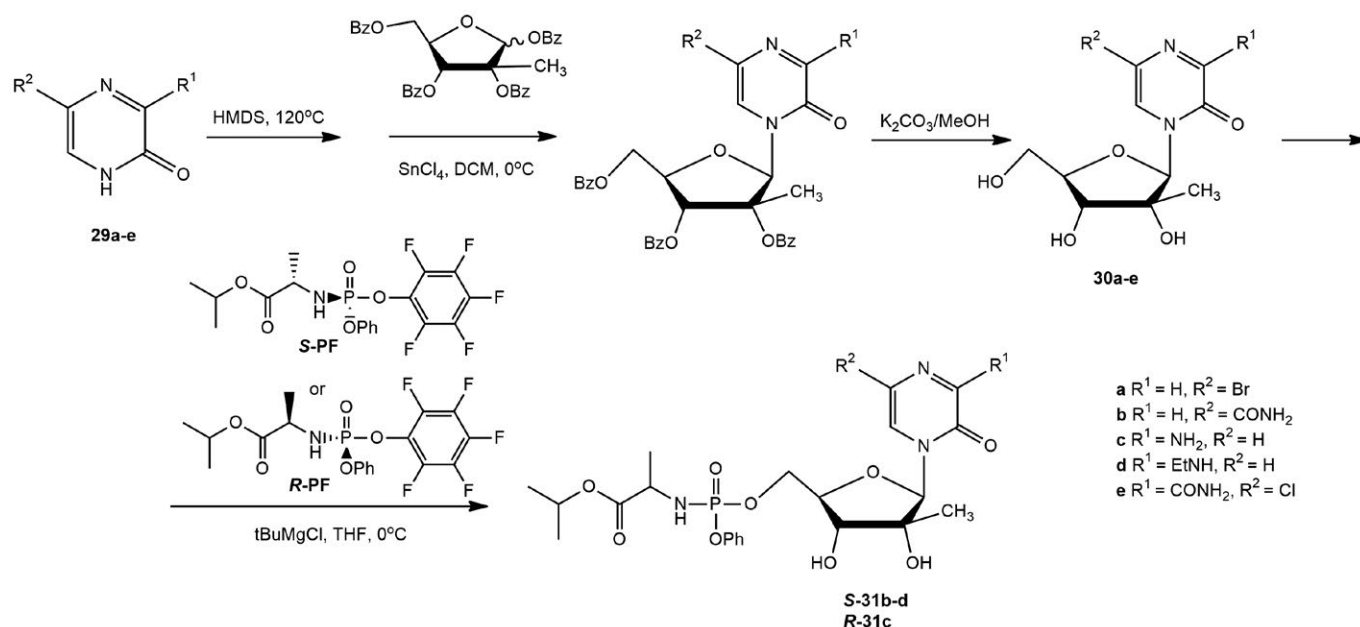


Рис. 19. Синтез 3-оксо-4-(2'-С-метил-β-D-рибофуранозил)-пиазинов и их 5'-фосфорамидатных пролекарств

вых противовирусных препаратов [79]. Описан синтез ряда нуклеозидов пиазина и пролекарств на их основе в виде фосфорамидатов (рис. 19) [80]. Оценивали активность полученных нуклеозидов в отношении вируса гепатита С (HCV). Синтез 3-оксо-4-(2'-С-метил-β-D-рибофуранозил)-пиазинов и их 5'-фосфорамидатных пролекарств осуществляли силильным методом, гликозилируя основания (**29a-e**) 1,2,3,5-тетра-О-бензоил-2-С-метил-β-D-рибофуранозой в присутствии тетраоксида олова ( $\text{SnCl}_4$ ). После удаления бензоильных (Bz) защитных групп синтезировали фосфорамидатные производные по реакции с S-PF или (R)-2-((R)-(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)фенокси)фосфориламино)изопропиловым эфиром пропионовой кислоты (R-PF).

Похожим способом из соответствующих оснований были синтезированы 3-оксо-4-(4'-С-метил-β-D-рибофуранозил)-пиазины, а также их 5'-фосфорамидатные пролекарства (рис. 20).

Исследование активности синтезированных соединений анти-HCV в условиях *in vitro* показало, что из соединений (**30a-d**) только (**30c**) продемонстрировало низкую степень ингибирования вируса, равную 22.3%, при концентрации 100 мкмоль/л. Наличие этиламинной группы в положении С3 гетероциклического кольца привело к потере противовирусной активности соединения (**30d**) и его (S)-фосфорамидата (**S-31d**). Соединение (**30e**) показало хорошую активность с  $\text{EC}_{50}$  7.3 мкмоль/л, однако по-

лучить на его основе фосфорамидатное пролекарство не удалось [80].

Предполагалось, что изменение положения метильной группы в остатке рибозы (соединения (**33a-c**)) позволит снизить их цитотоксичность. Однако среди этих соединений только (S)-изомерное фосфорамидатное пролекарство (**S-34b**) не было цитотоксичным при концентрации 100 мкмоль/л, но показало слабую активность ( $\text{EC}_{50} = 19.5$  мкМ) [80].

На основе нефторированного основания Т-1105 синтезирован 3-оксо-4-(2'-С-метил-β-D-рибофуранозил)-2-пиазинкарбоксамид (рис. 21) в виде смеси α- и β-аномеров. После аммонолиза бензоильных (Bz) защитных групп целевой β-аномер продукта (**35a**) смогли выделить с выходом всего 10%, также был выделен и α-аномер (**35b**) с выходом 80% [81].

К сожалению, нуклеозиды (**35a**) и (**35b**) не показали ни противовирусной активности против РНК-вирусов, ни цитотоксичности *in vitro* в концентрации до 100 мкмоль/л [81].

Обычно в синтезе модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов на основе Т-705 и Т-1105 используются классические химические способы гликозилирования. Например, синтез 3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил)-2-пиазинкарбоксамида (**5**) (рис. 22) проводят по реакции Форбрюггена обработкой 3-гидроксипиазин-2-карбоксамида (Т-1105) 1,2,3,5-тетра-О-ацетил-β-D-рибофуранозой в безводном ацетонитриле ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) в присутствии

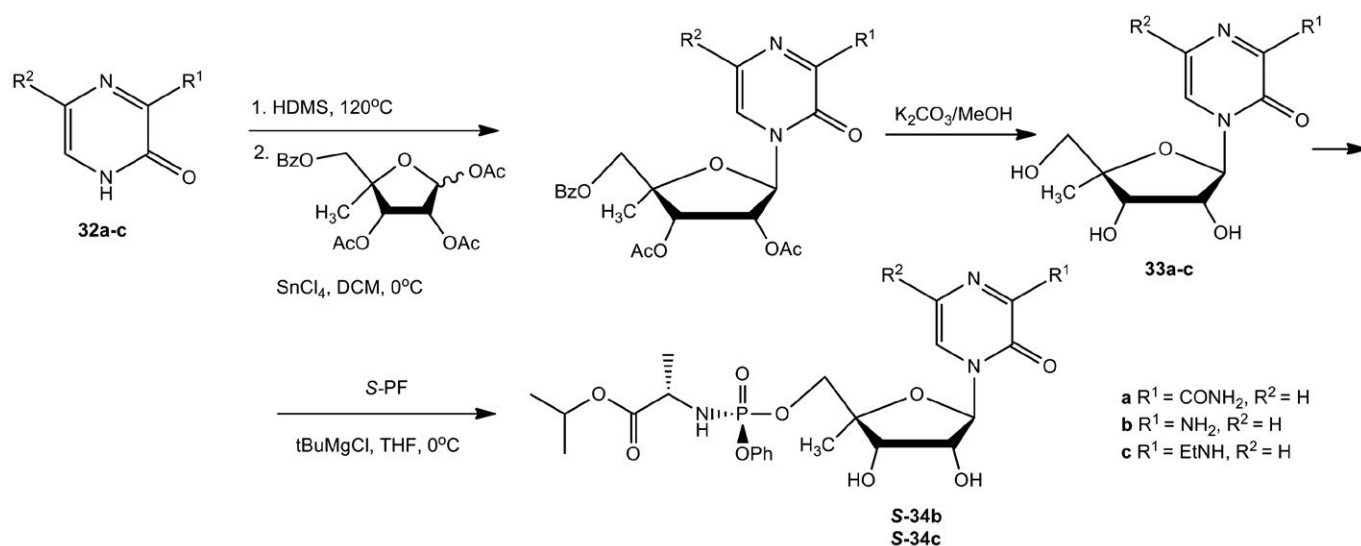
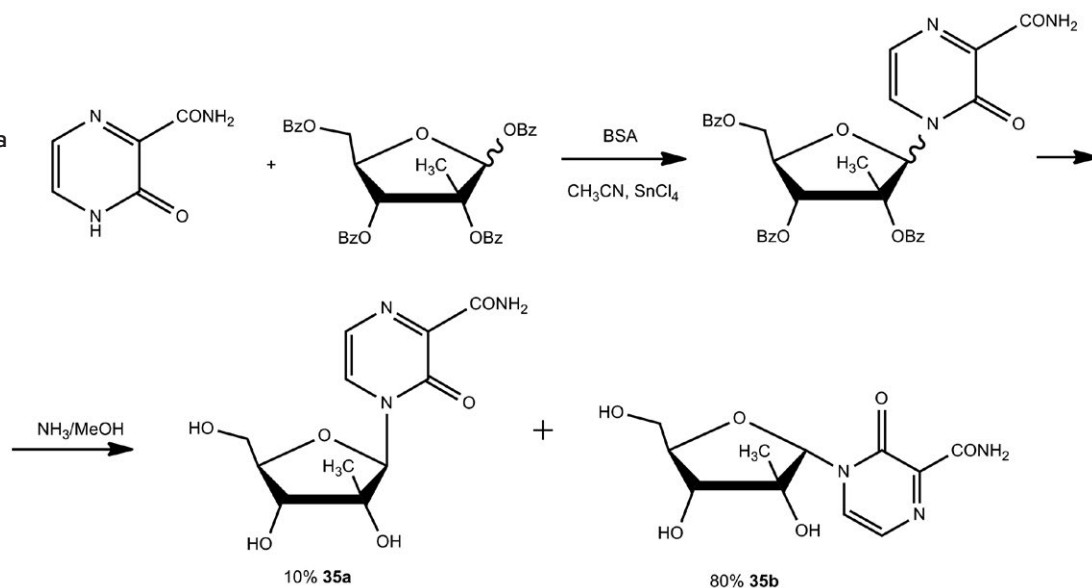


Рис. 20. Синтез 3-оксо-4-(4'-С-метил-β-D-рибофуранозил)-пиразинов и пролекарств, содержащих 5'-фосфорамидатный фрагмент

Рис. 21. Синтез 3-оксо-4-(2'-С-метил-β-D-рибофуранозил)-2-пиразинкарбоксамида (BSA – N,O-бис(триметилсилил)-ацетамид)



N,O-бис(триметилсилил)ацетамида при комнатной температуре с последующим добавлением триметилсилилтрифторметансульфоната. Выход целевого продукта по данной методике составляет 55% [82].

Химический синтез 6-фтор-3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил)-2-пиразинкарбоксамида (**19c**) (рис. 23) можно осуществить обработкой С6-замещенного 3-гидропиразин-2-карбоксамида сульфатом аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в гексаметилдисилазане при 140°C.

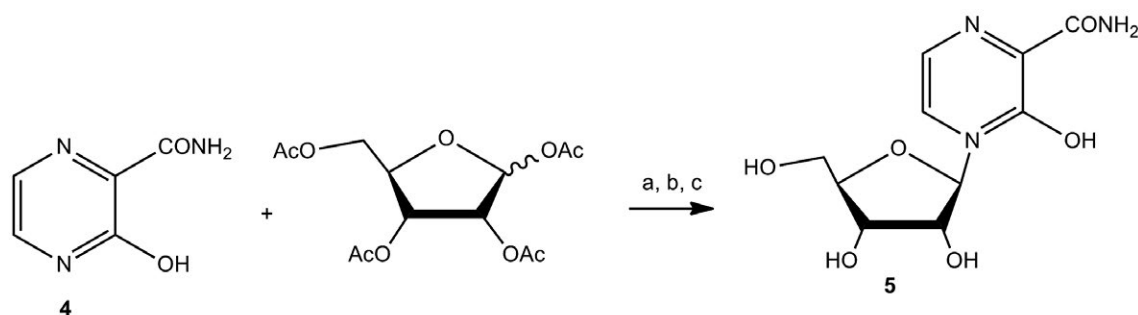
Полученный силилированный пиразинкарбоксамид вводят во взаимодействие с перацелированной рибофуранозой в присутствии тетраоксида олова ( $\text{SnCl}_4$ ). Выход чистого нуклеозида после хромато-

графической очистки составляет 40%. Перенос оптимизированных условий синтеза 6-фтор-3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил)-2-пиразинкарбоксамида для 6-бромзамещенного аналога фапиравира позволил получить соединение (**37**) с выходом 68% [82].

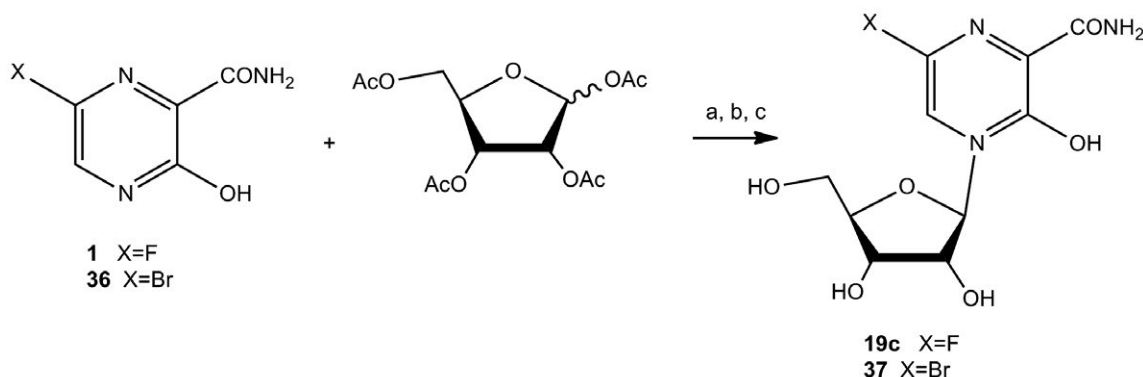
В 2018 г. J. Huchting представила схему синтеза фосфата рибозида Т-1105 (**38**) (рис. 24) и аналогичный способ синтеза нуклеотида фапиравира [83]. Huchting и соавт. удалось химическим способом синтезировать нуклеозид 5'-моно-, ди- и трифосфатную форму Т-1105.

Наиболее эффективным путем синтеза 3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил-5'-фосфат)-2-пиразинкарбоксамида (**33**) оказалось фосфорилирование





**Рис. 22.** Синтез 3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил)-2-пирозинкарбоксамида (**5**). а) 1,2,3,5-тетра-О-ацетил-β-D-рибофураноза, N,O-бис(триметилсилил)ацетамид, ацетонитрил, 30 мин,  $t_{\text{комн.}}$ ; б) триметилсилилтрифторметансульфонат, ацетонитрил, 44 ч,  $t_{\text{комн.}}$ ; с) метанол, вода, триэтиламин, 6 ч,  $t_{\text{комн.}}$



**Рис. 23.** Синтез 6-фтор-3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил)-2-пирозинкарбоксамида (**19c**) и 6-бром-3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил)-2-пирозинкарбоксамида (**37**): а) гексаметилдисилазан,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 140°C; б)  $\text{SnCl}_4$ , ацетонитрил,  $t_{\text{комн.}}$ ; с)  $\text{Bu}_2\text{SnO}$ , метанол, 80°C

соединения (**5**) с предварительной защитой 2'- и 3'-ОН-групп рибозы. Выход целевого соединения (**38**) составил 47% [83].

Синтез нуклеозид 5'-ди- и трифосфатной формы T-1105 осуществляли последовательным двухступенчатым синтезом с применением флуоренилметильных (Fm) защитных групп (рис. 25).

Для улучшения липофильности и экранирования отрицательно заряженных групп нуклеотидов T-1105 и T-705 синтезированы депо-формы в виде *cycloSal*-пронуклеотидов, *DiPPro* и *TriPPPro* (рис. 26). *CycloSal*-пронуклеотиды являются пролекарствами, контролируемое высвобождение активных нуклеотидов происходит pH-зависимым образом. Их получали с использованием фосфорамидатного синтеза. Активация *DiPPPro* и *TriPPPro* пролекарств включает в себя основной и второстепенный путь. Основной путь заключается в активации этих соединений эстеразами и последующим эффективным высвобождением нуклеотидов [83].

Второстепенный метаболический путь включает гидролитическое расщепление фосфоанги-

дрида в пронуклеотиде, что приводит к образованию нежелательного нуклеотида [83]. Изучена противовирусная активность данных соединений в клетках MDCK и MDCK-TG<sup>res</sup> (клеточная линия, обедненная HGPRT) с использованием двух штаммов гриппа A/X-31 (подтип A/H3N2) и B/Ned/537/05. Цитотоксичность соединений оценивали в неинфицированных клетках. Наибольшая противовирусная активность и минимальная токсичность обнаружены у соединения (**36**). Среднее значение  $\text{EC}_{50}$  составило 0.91 мкмоль/л в клетках MDCK. Все *DiPPPro* и *TriPPPro* соединения сохраняли противовирусную активность в клетках MDCK-TG<sup>res</sup>. Например, среднее значение  $\text{EC}_{50}$  для соединения (**36**) в клетках MDCK-TG<sup>res</sup> составило 0.80 мкмоль/л [83].

Очевидно, что разработка простых и эффективных ферментативных способов синтеза модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов на основе 3-гидрокси-пирозин-2-карбоксамида и его 6-фторзамещенного аналога крайне актуальна.

На данный момент опубликовано только одно краткое сообщение, посвященное ферментатив-

Рис. 24. Схема синтеза фосфата рибозиды Т-1105; DCl – дицианоимидазол; TEA – триэтиламин

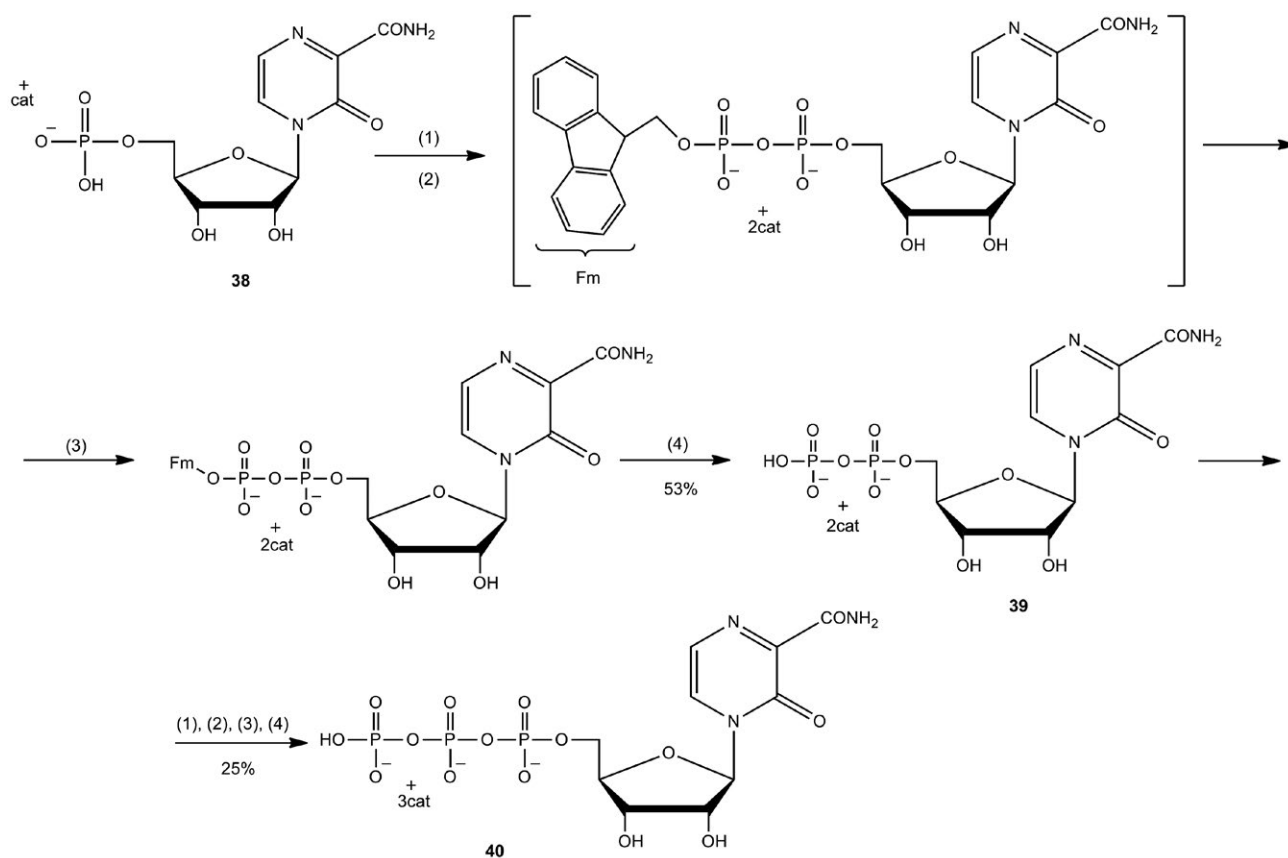
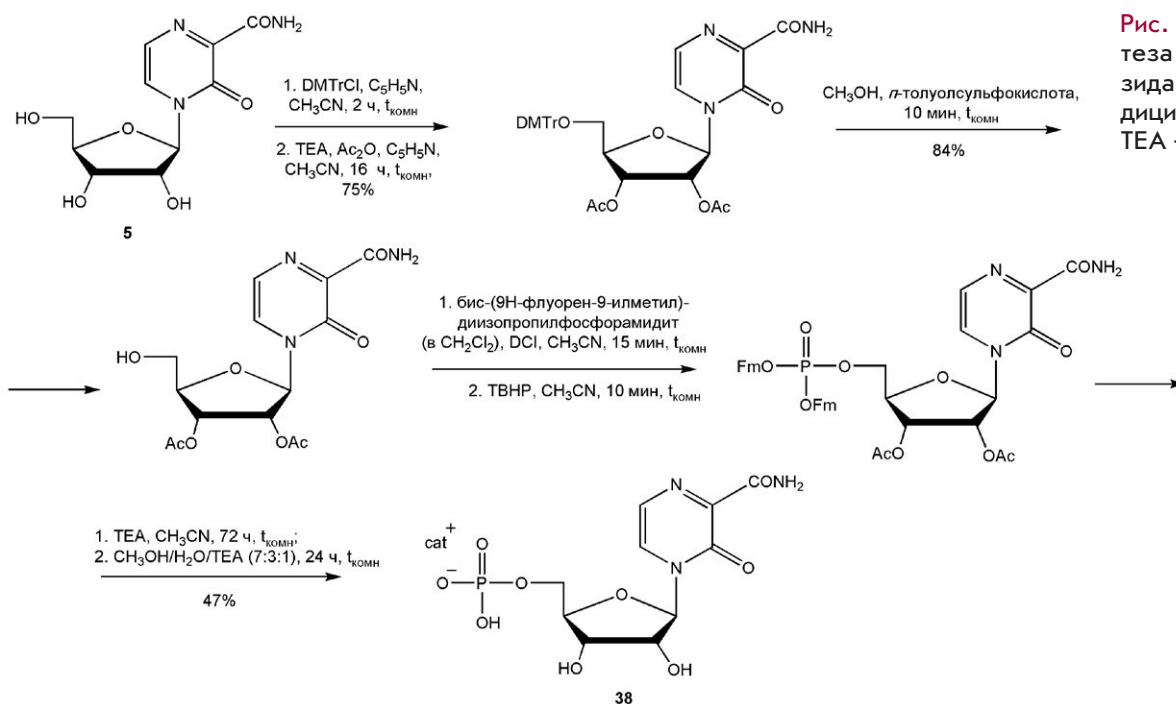


Рис. 25. Синтез 3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил-5'-дифосфат)-2-пиазинкарбоксамиды (**39**) и 3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил-5'-трифосфат)-2-пиазинкарбоксамиды (**40**): (1) бис(9H-фтор-9-илметил)диизопропиламинофосфорамидит в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, дицианоимидазол, DMF; (2) трет-бутилгидроксипероксид (ТВНР), DMF; (3) TEA, CH<sub>3</sub>CN; (4) TEA, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN

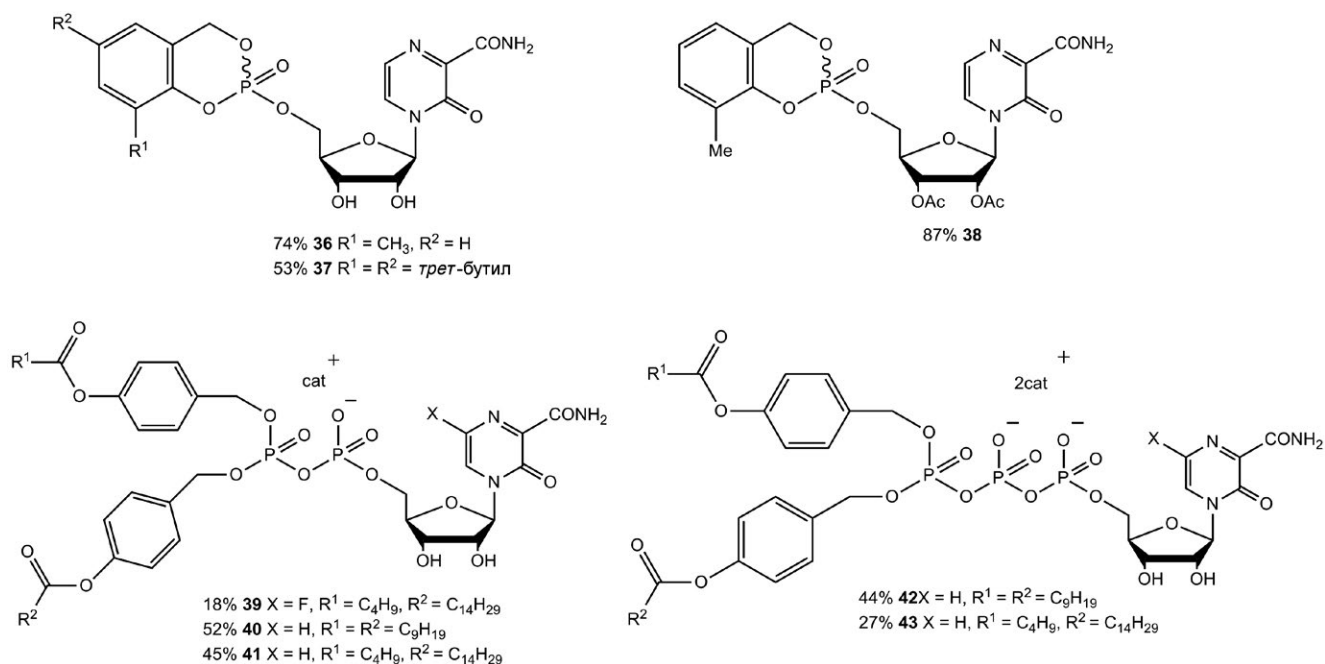


Рис. 26. Структурные формулы *сус*loSal-пронуклеотидов (**28**)–(**30**), DiPPPro и TriPPPPro соединений (**31**)–(**35**)

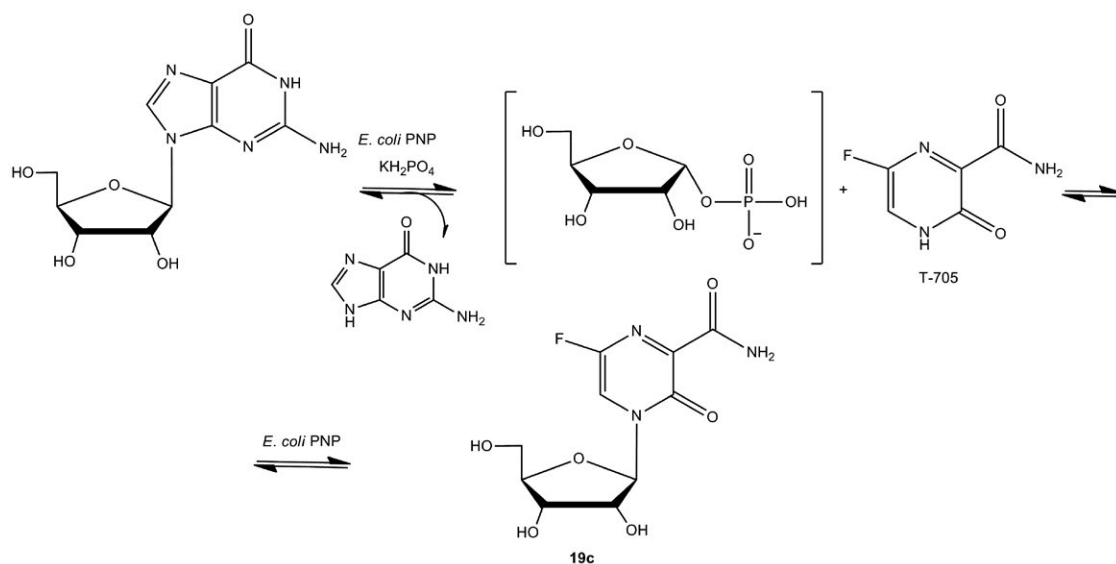


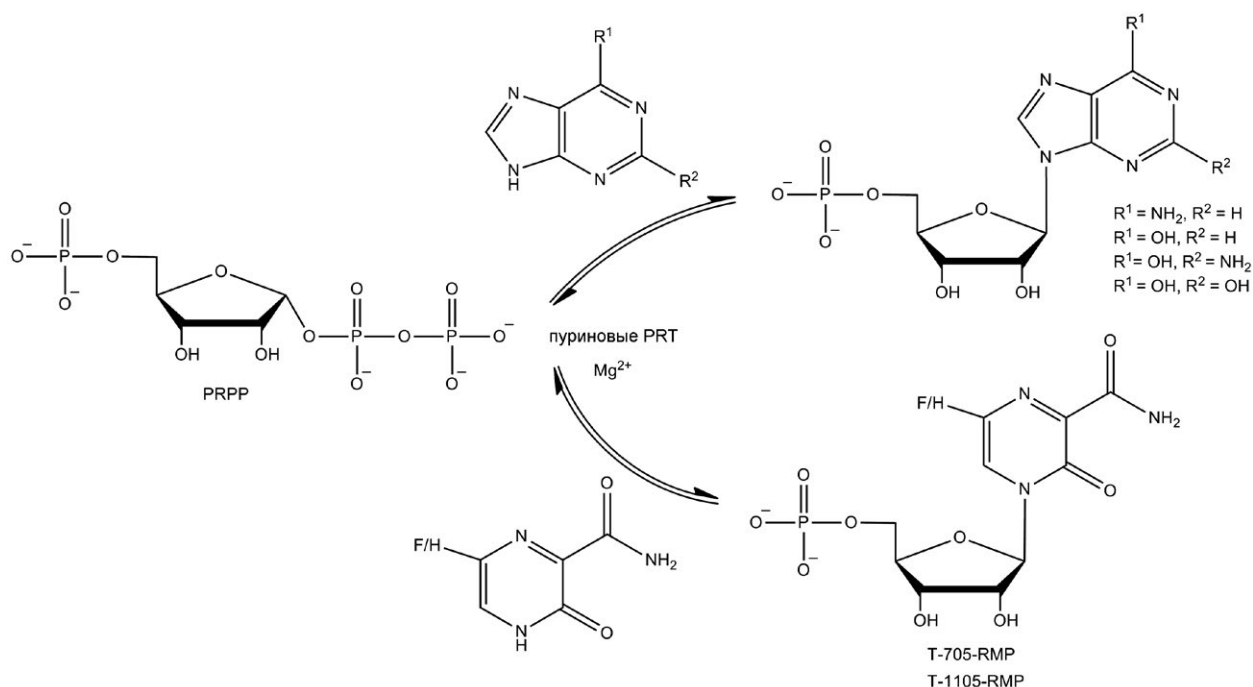
Рис. 27. Ферментативный синтез рибозида Т-705

ному синтезу модифицированных нуклеозидов на основе замещенных 3-гидрокси-пиримидин-2-карбоксамидов с помощью пурин-нуклеозидфосфорилазы *E. coli* (PNP) [84]. Эффективность переноса основания Т-705 на остаток рибозы составила 43% за 4 ч (рис. 27). Однако в работе не указан выход и не приведены спектральные характеристики продукта.

Рибозилтрансферазы участвуют в образовании всех С-*N*-гликозидных связей нуклеозидмонофосфатов в пути биосинтеза *de novo*. Пуриновые

фосфорибозилтрансферазы катализируют обратимый перенос 5-фосфорибозильной группы с PRPP на азот по положению 9 в 6-амино- или 6-оксопуринах в присутствии Mg<sup>2+</sup> с образованием соответствующих рибозо-5'-монофосфатов [85].

В соответствии с субстратной специфичностью, пуриновые фосфорибозилтрансферазы делятся на два основных класса: 6-аминопуриновые (APRT) и 6-оксопуриновые (HPRT, HGPRT и т.д.). APRT строго специфичны к 6-аминопуринам, таким, как аденин, 2-фтораденин или 2-хлораденин.



**Рис. 28.** Ферментативный синтез рибозо-5'-монофосфатов, катализируемый фосфорибозилтрансферазами (PRT)

6-Оксопуриновые PRT могут распознавать различные 6-оксопурины, такие, как гипоксантин, гуанин, ксантин и другие 6-оксо- и 6-меркаптопуриновые аналоги [85].

Как уже известно, активным метаболитом фавипиравира и 3-гидроксипирозин-2-карбоксамидом является их рибозо-5'-трифосфатная форма, участвующая в подавлении активности РНК-вирусов. Naesens и соавт. [21] удалось установить, что на первом этапе, при попадании Т-705 и Т-1105 в клетку HGPRT человека фосфорилирует Т-705 до 6-фтор-3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил-5'-фосфат)-2-пирозинкарбоксамид (Т-705-RMP), а Т-1105 в 3-оксо-4-(β-D-рибофуранозил-5'-фосфат)-2-пирозинкарбоксамид (Т-1105-RMP) (рис. 28). Однако как в условиях синтеза, так и в условиях внутриклеточного фосфорилирования Т-705 и Т-1105 проявляют низкое сродство к активному центру HGPRT. Обнаружено, что APRT человека катализирует фосфорилирование Т-705 и Т-1105 в 40 раз менее эффективно, чем HGPRT в аналогичных условиях. Кроме того, этой же группой ученых установлено, что Т-705 и Т-1105 являются плохими субстратами для PNP человека [21].

Известно использование экстракта клеток линии MDCK для оценки профилей метаболической активации фавипиравира и 3-гидроксипирозин-2-карбоксамидом [83]. Фосфорилирование

фавипиравира в клеточном экстракте MDCK протекает менее эффективно по сравнению с 3-гидроксипирозин-2-карбоксамидом. Образование метаболита Т-705-RMP в клеточном экстракте MDCK при инкубировании Т-705 с 5-фосфорибозил-α-1-пирофосфатом (PRPP) составило 35% после 25 ч инкубации. Образование метаболита Т-1105-RMP в клеточном экстракте MDCK при инкубировании Т-1105 с PRPP после 19 ч инкубации составило 90%. Дальнейшее инкубирование Т-1105-RMP с экстрактом клеток MDCK в течение 15 ч не привело к образованию ни Т-1105-RDP, ни Т-1105-RTP даже при добавлении высокой концентрации АТФ (донора фосфата). Однако, когда Т-1105-RDP инкубировали с в 10 раз более высокой концентрацией АТФ, его фосфорилирование оказалось эффективным: Т-1105-RTP образовывался через 2 мин после инкубации и оставался основным метаболитом в течение следующих 2 ч.

Единичные примеры биосинтеза нуклеозидов и нуклеотидов пирозинкарбоксамидом свидетельствуют о том, что основными способами их синтеза остаются классические химические методы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фавипиравир Т-705 и некоторые его структурные аналоги обладают выраженным противовирусным действием в отношении РНК-вирусов. Однако боль-



шая дозовая нагрузка (до 3.6 г фавапиривира в сутки при лечении COVID-19), плохая биодоступность вследствие низкой растворимости, высокая системная токсичность и тератогенная активность препарата побуждают исследователей синтезировать все новые и новые структурные аналоги с целью увеличения селективности действующей молекулы и снижения ее токсичности.

Вероятнее всего, применение нуклеозидов фавапиривира и его структурных аналогов может снизить дозовую нагрузку на организм человека и уменьшить токсический эффект от применения препарата. На сегодняшний день синтезировано множество нуклеозидов пиразинкарбоксамидов, модифицированных по гетероциклическому основанию и углеводному остатку. Получена серия ациклических линейных аналогов, а также нукле-

озидов, модифицированных по 5'-гидроксильной группе рибозы. Однако эффективность таких соединений в терапии вирусных поражений организма человека еще только предстоит доказать.

Таким образом, структурные аналоги 1,4-пиразин-3-карбоксамидов могут стать основой для разработки новых селективных и высокоэффективных противовирусных препаратов, применяемых в периоды пандемий вирусных заболеваний и в ряде случаев крайне тяжелого течения вирусных инфекций. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-13-00429).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Woolhouse M., Scott F., Hudson Z., Howey R., Chase-Topping M. // *Philosophical Transactions Royal Soc. B-Biol. Sci.* 2012. V. 367. № 1604. P. 2864–2871. doi: 10.1098/rstb.2011.0354
- Carrasco-Hernandez R., Jácome R., López Vidal Y., Ponce de León S. // *ILAR J.* 2017. V. 58 № 3. P. 343–358. doi: 10.1093/ilar/ilx026
- Pilkington V., Pepperrell T., Hill A. // *J. Virus Eradication.* 2020. V. 6(2). P. 45–51. doi: 10.1016/S2055-6640(20)30016-9
- Kolb V.M. // *Progress Drug Res.* 1997. V. 48. P. 195–232. doi: 10.1007/978-3-0348-8861-5\_8
- Mahmoud S., Hasabelnaby S., Hammad S., Sakr T. // *J. Adv. Pharmacy Res.* 2018. V. 2. № 2. P. 73–88. doi: 10.21608/aprh.2018.5829
- Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y., Kuno M., Kamiyama T., Kozaki K., Nomura N., Egawa H., Minami S., Watanabe Y., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 4. P. 977–981. doi: 10.1128/AAC.46.4.977-981.2002
- Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K., Sakamoto K., Smee D.F., Barnard D.L., Gowen B.B., Julander J.G., Morrey J.D. // *Antiviral Res.* 2009. V. 82. P. 95–102. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.02.198
- Furuta Y., Komeno T., Nakamura T. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2017. V. 93. № 7. P. 449–463. doi: 10.2183/pjab.93.027
- De Clercq E., Li G. // *Clin. Microbial. Rev.* 2016. V. 29. № 3. P. 695–747. doi: 10.1128/CMR.00102-15
- Delang L., Abdelnabi R., Neyts J. // *Antiviral Res.* 2018. V. 153. P. 85–94. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.03.003
- Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K., Shiraki K., Smee D.F., Barnard D.L. // *Antiviral Res.* 2013. V. 100. № 2. P. 446–454. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015
- L'Huillier A.G., Abed Y., Petty T.J., Cordey S., Thomas Y., Bouhy X., Schibler M., Simon A., Chalandon Y., van Delden C., et al. // *J. Infect. Dis.* 2015. V. 212. № 1. P. 1726–1734. doi: 10.1093/infdis/jiv288
- Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M., Furuta Y., Klimov A.I., Gubareva L.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 6. P. 2517–2524. doi: 10.1128/AAC.01739-09
- Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y., Shinya K., Sakabe S., Le Q.M., Ozawa M., Furuta Y., Kawaoka Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 2. P. 882–887. doi: 10.1073/pnas.0909603107
- Watanabe T., Kiso M., Fukuyama S., Nakajima N., Imai M., Yamada S., Murakami S., Yamayoshi S., Iwatsuki-Horimoto K., Sakoda Y., et al. // *Nature.* 2013. V. 501. № 7468. P. 551–555. doi: 10.1038/nature12392
- Smee D.F., Hurst B.L., Wong M.H., Bailey K.W., Tarbet E.B., Morrey J.D., Furuta Y. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 1. P. 126–133. doi: 10.1128/AAC.00933-09
- Marathe B., Wong S.S., Vogel P., Garcia-Alcalde F., Webster R.G., Webby R.J., Najera I., Govorkova E.A. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 26742. doi: 10.1038/srep26742
- Smee D.F., Tarbet E.B., Furuta Y., Morrey J.D., Barnard D.L. // *Future Virol.* 2013. V. 8. № 11. P. 1085–1094. doi: 10.2217/fvl.13.98
- Tarbet E.B., Maekawa M., Furuta Y., Babu Y.S., Morrey J.D., Smee D.F. // *Antiviral Res.* 2012. V. 94. № 1. P. 103–110. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.03.001
- Furuta Y., Takahashi K., Kuno-Maekawa M., Sangawa H., Uehara S., Kozaki K., Nomura N., Egawa H., Shiraki K. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 3. P. 981–986. doi: 10.1128/AAC.49.3.981-986.2005
- Naesens L., Guddat L.W., Keough D.T., van Kuilenburg A.B., Meijer J., Vande Voorde J., Balzarini J. // *Mol. Pharmacol.* 2013. V. 84. № 4. P. 615–629. doi: 10.1124/mol.113.087247
- Sangawa H., Komeno T., Nishikawa H., Yoshida A., Takahashi K., Nomura N., Furuta Y. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 11. P. 5202–5208. doi: 10.1128/AAC.00649-13
- Davidson S. // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 1946. doi: 10.3389/fimmu.2018.01946
- Cheung P.P.H., Watson S.J., Choy K.-T., Sia S.F., Wong D.D.Y., Poon L.L.M., Kellam P., Guan Y., Peiris J.S.M., Yen H.-L. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. № 1. P. 1–13. doi: 10.1038/ncomms5794
- Goldhill D.H., Te Velthuis A.J., Fletcher R.A., Langat P., Zambon M., Lackenby A., Barclay W.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 45. P. 11613–11618. doi: 10.1073/pnas.1811345115

26. Delang L., Segura Guerrero N., Tas A., Querat G., Pastorino B., Froeyen M., Dallmeier K., Jochmans D., Herdewijn P., Bello F., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. V. 69. № 10. P. 2770–2784. doi: 10.1093/jac/dku209
27. Abdelnabi R., Morais A.T.S., Leyssen P., Imbert I., Beaucourt S., Blanc H., Froeyen M., Vignuzzi M., Canard B., Neyts J., et al. // *J. Virol.* 2017. V. 91. № 1–2. pii: e00487-17. doi: 10.1128/JVI.00487-17
28. Jin Z., Smith L.K., Rajwanshi V.K., Kim B., Deval J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 7. P. e68347. doi: 10.1371/journal.pone.0068347
29. Baranovich T., Wong S.S., Armstrong J., Marjuki H., Webby R.J., Webster R.G., Govorkova E.A. // *J. Virol.* 2013. V. 87. P. 3741–3751. doi: 10.1128/JVI.02346-12
30. de Avila A.I., Gallego I., Soria M.E., Gregori J., Quer J., Esteban J.I., Rice C.M., Domingo E., Perales C. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 10. P. e0164691. doi: 10.1371/journal.pone.0164691
31. Escribano-Romero E., Jimenez de Oya N., Domingo E., Saiz J.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017. V. 61. № 11. pii: e01400-17. doi: 10.1128/AAC.01400-17
32. Qiu L., Patterson S.E., Bonnac L.F., Geraghty R.J. // *PLoS Neglected Trop. Dis.* 2018. V. 12. № 4. P. e0006421. doi: 10.1371/journal.pntd.0006421
33. Guedj J., Piorkowski G., Jacquot F., Madelain V., Nguyen T.H.T., Rodallec A., Gunther S., Carbonnelle C., Mentre F., Raoul H., et al. // *PLoS Med.* 2018. V. 15. № 3. P. e1002535. doi: 10.1371/journal.pmed.1002535
34. Schuster P. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2016. V. 392. P. 61–120. doi: 10.1007/82\_2015\_469
35. Pauly M.D., Procaro M.C., Lauring A.S. // *Elife.* 2017. V. 6. e26437. doi: 10.7554/eLife.26437.001
36. Perales C., Martin V., Domingo E. // *Curr. Opin. Virol.* 2011. V. 1. P. 419–422. doi: 10.1016/j.coviro.2011.09.001
37. Hayden F.G., Shindo N. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2019. V. 32. № 2. P. 176–186. doi: 10.1097/QCO.0000000000000532
38. de Almeida S.M.V., Soares J.C.S., dos Santos K.L., Alves J.E.F., Ribeiro A.G., Jacob Í.T.T., da Silva Ferreira C.J., dos Santos J.C., de Oliveira J.F., de Carvalho Junior L.B. // *Bioorganic & Med. Chem.* 2020. V. 28. № 23. P. 115757. doi: 10.1016/j.bmc.2020.115757
39. Lima W.G., Brito J.C.M., Overhage J., da Cruz Nizer W.S. // *Arch. Virol.* 2020. V. 165. P. 1729–1737. doi: 10.1007/s00705-020-04693-5
40. Danta C.C. // *ACS Chem. Neurosci.* 2020. V. 11. № 15. P. 2137–2144. doi: 10.1021/acschemneuro.0c00335
41. Konstantinidou S.K., Papanastasiou I.P. // *Exp. Ther. Med.* 2020. V. 20. P. 1845–1855. doi: 10.3892/etm.2020.8905
42. Wang M., Cao R., Zhang L., Yang X., Liu J., Xu M., Shi Z., Hu Z., Zhong W., Xiao G. // *Cell Res.* 2020. V. 30. № 3. P. 269–271. doi: 10.1038/s41422-020-0282-0
43. Choy K.-T., Wong A.Y.-L., Kaewpreedee P., Sia S.F., Chen D., Hui K.P.Y., Chu D.K.W., Chan M.C.W., Cheung P.P.-H., Huang X., et al. // *Antiviral Res.* 2020. V. 178. P. 104786. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104786
44. Jin Z., Kinkade A., Behera I., Chaudhuri S., Tucker K., Dyatkina N., Rajwanshi V.K., Wang G., Jekle A., Smith D.B. // *Antiviral Res.* 2017. V. 143. P. 151–161. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.04.005
45. Chen C., Zhang Y., Huang J., Yin P., Cheng Z., Wu J., Chen S., Zhang Y., Chen B., Lu M., et al. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 21. Art. 683296. doi: 10.3389/fphar.2021.683296
46. Cai Q., Yang M., Liu D., Chen J., Shu D., Xia J., Liao X., Gu Y., Cai Q., Yang Y., et al. // *Engineering.* 2020. V. 6. P. 1192–1198. doi: 10.1016/j.eng.2020.03.007
47. Ivashchenko A.A., Dmitriev K.A., Vostokova N.V., Azarova V.N., Blinow A.A., Egorova A.N., Gordeev I.G., Ilin A.P., Karapetian R.N., Kravchenko D.V., et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2021. V. 73. P. 531–534. doi: 10.1093/cid/ciaa1176
48. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04542694?term=favipiravir&draw=2&rank=47>
49. <https://www.pharmaceutical-technology.com/news/china-approves-favilavir-covid-19/>
50. Agrawal U., Raju R., Udawadia Z.F. // *Med. J. Armed. Forces India.* 2020. V. 76. № 4. P. 370–376. doi: 10.1016/j.mjafi.2020.08.004
51. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). 7-е изд. М.: МЗ РФ, 2020. 166 с. [http://edu.rosminzdrav.ru MR\\_COVID-19\\_v7.pdf](http://edu.rosminzdrav.ru MR_COVID-19_v7.pdf).
52. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 13.1 (17.11.2021). 236 с. <https://static-0.minzdrav.gov.ru BMP-13.1-from-17-11-2021.pdf>
53. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2021 год (<https://mine-med.ru/archive/p2021p1.pdf>).
54. Государственный реестр лекарственных средств – <https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=фавипиравир&lf=таблетки&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&regtype=1%2c6&pageSize=10&order=RegDate&orderType=desc&pageNum=1>
55. <https://lenta.ru/news/2021/11/12/lecheniecovid/>
56. Huchting J., Vanderlinden E., van Berwaer R., Meier C., Naesens L. // *Antiviral Res.* 2019. V. 167. P. 1–5. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.04.002
57. De Vleeschauwer A.R., Lefebvre D.J., Willems T., Paul G., Billiet A., Murao L.E., Neyts J., Goris N., De Clercq K. // *Transboundary Emerging Diseases.* 2016. V. 63. № 2. P. e205–e212. doi: 10.1111/tbed.12255
58. Julander J.G., Furuta Y., Shafer K., Sidwell R.W. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. V. 51. № 6. P. 1962–1966. doi: 10.1128/AAC.01494-06
59. Julander J.G., Shafer K., Smee D.F., Morrey J.D., Furuta Y. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. V. 53. № 1. P. 202–209. doi: 10.1128/AAC.01074-08
60. Gowen B.B., Wong M.-H., Jung K.-H., Smee D.F., Morrey J.D., Furuta Y. // *Antiviral Res.* 2010. V. 86. № 2. P. 121–127. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.015
61. Titova Y.A., Fedorova O.V. // *Chem. Heterocycl. Comp.* 2020. V. 56. № 6. P. 659–662. doi: 10.1007/s10593-020-02715-3
62. Al Bujug N. // *Synthesis.* 2020. V. 52. № 24. P. 3735–3750. doi: 10.1055/s-0040-1707386
63. Qin N., Min Q., Hu W. // *J. Compar. Chem.* 2020. V. 4. № 1. P. 1–11. doi: 10.12677/CC.2020.41001
64. Furuta Y., Egawa H. Патент № WO2000/010569. Япония. C07D 237/24 2006.1. 2000.
65. Egawa H., Furuta Y., Sugita J., Uehara S., Hamamoto S., Yonesawa K. Патент № WO 2001/060834. Япония. C07H 19/04 2006.1. 2001.
66. Hara H., Norimatsu N., Kurushima H., Kano T. Патент № 2011.0275817A1. США. C07D 241/16 2006.1. 2011.
67. Takamatsu T., Yonezawa K. Патент № WO 2009/041473. Япония. C07D 241/24 2006.1. 2009.
68. Liu F.-L., Li C.-Q., Xiang H.-Y., Feng S. // *Chem. Papers.* 2017. V. 71. № 11. P. 2153–2158. doi: 10.1007/s11696-017-0208-6
69. Shi F., Li Z., Kong L., Xie Y., Zhang T., Xu W. // *Drug Discov. Therapeut.* 2014. V. 8. № 3. P. 117–120. doi: 10.5582/ddt.2014.01028

70. Guo Q., Xu M., Guo S., Zhu F., Xie Y., Shen J. // *Chem. Papers*. 2019. V. 73. № 5. P. 1043–1051. doi: 10.1007/s11696-018-0654-9
71. Rabie A.M. // *Chem. Papers*. 2021. V. 75. № 9. P. 4669–4685. doi: 10.1007/s11696-021-01640-9
72. Seliem I.A., Girgis A.S., Moatasim Y., Kandeil A., Mostafa A., Ali M.A., Panda S.S. // *ChemMedChem*. 2021. V. 16. № 22. P. 3418–3427. doi: 10.1002/cmdc.202100476
73. Wu Y. Патент № 105884827. Китай. C07F 9/6509 2006.1. 2016.
74. Moshikur R.M., Ali M.K., Wakabayashi R., Moniruzzaman M., Goto M. // *Mol. Pharmaceut.* 2021. V. 18. № 8. P. 3108–3115. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00324
75. Moshikur R.M., Chowdhury M.R., Wakabayashi R., Tahara Y., Moniruzzaman M., Goto M. // *Internat. J. Pharmaceut.* 2018. V. 546. № 1–2. P. 31–38. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.021
76. Cai L., Sun Y., Song Y., Xu L., Bei Z., Zhang D., Dou Y., Wang H. // *Arch. Virol.* 2017. V. 162. № 9. P. 2847–2853. doi: 10.1007/s00705-017-3436-8
77. Wang G., Wan J., Hu Y., Wu X., Prhac M., Dyatkina N., Rajwanshi V.K., Smith D.B., Jekle A., Kinkade A. // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. № 10. P. 4611–4624. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01933
78. Klejch T., Pohl R., Janeba Z., Sun M., Keough D.T., Guddat L.W., Hocková D. // *Tetrahed.* 2018. V. 74. № 40. P. 5886–5897. doi: 10.1016/j.tet.2018.08.014
79. Pertusati F., Serpi M., McGuigan C. // *Antiviral Chem. Chemother.* 2012. V. 22. № 5. P. 181–203. doi: 10.3851/IMP2012
80. Guo S., Xu M., Guo Q., Zhu F., Jiang X., Xie Y., Shen J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2019. V. 27. № 5. P. 748–759. doi: 10.1016/j.bmc.2019.01.007
81. Pierra C., Counor C., Storer R., Gosselin G. // *Collect. Czech. Chem. Com.* 2011. V. 76. № 11. P. 1327–1333. doi: 10.1135/cccc2011089
82. Huchting J., Winkler M., Nasser H., Meier C. // *ChemMedChem*. 2017. V. 12. № 9. P. 652–659. doi: 10.1002/cmdc.201700116
83. Huchting J., Vanderlinden E., Winkler M., Nasser H., Naesens L., Meier C. // *J. Med. Chem.* 2018. V. 61. № 14. P. 6193–6210. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00617
84. Bulatovski A., Zinchenko A. // *Biotehnologii moderne-soluții pentru provocările lumii contemporane*. 2021. C. 133–133. doi.org/10.52757/imb21.075
85. Arco J.D., Fernandez-Lucas J. // *Cur. Pharm. Des.* 2017. V. 23. № 45. P. 6898–6912. doi: 10.2174/1381612823666171017165707

УДК 577.22

# Биогенез рибосом эукариот: 60S субъединица

А. А. Моралева<sup>1</sup>, А. С. Дерябин<sup>1\*</sup>, Ю. П. Рубцов<sup>1</sup>, М. П. Рубцова<sup>2\*</sup>, О. А. Донцова<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия<sup>3</sup>Сколковский институт наук и технологий, Москва, 121205 Россия

\*E-mail: deryabin95@mail.ru, mprubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 29.07.2021

Принята к печати 11.02.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11541

**РЕФЕРАТ** Биогенез рибосом – последовательное скоординированное созревание рибосомных предшественников в ядрышке, нуклеоплазме и цитоплазме. В формировании зрелых субъединиц рибосом принимают участие сотни факторов, которые обеспечивают процессинг рибосомных РНК, формирование их третичной структуры, а также взаимодействие с ними рибосомных белков. Основные особенности и стадии биогенеза рибосом одинаковы в разных группах эукариот, однако в клетках человека этот процесс претерпел усложнение из-за увеличения размера рибосом и прерибосом, а также усложнения регуляторных путей, влияющих на их сборку и функцию. С помощью полногеномных скринингов на основе РНК-интерференции выявлено множество факторов, необходимых для биогенеза именно рибосом человека. В первой части обзора суммированы последние результаты изучения процессинга первичного транскрипта рРНК, а также сравниваются процессы созревания малой 40S субъединицы в клетках дрожжей и человека. В представленной второй части обзора основное внимание уделено биогенезу большой 60S субъединицы эукариотических рибосом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ядрышко, биогенез рибосом, рибосомопатии.

## ВВЕДЕНИЕ

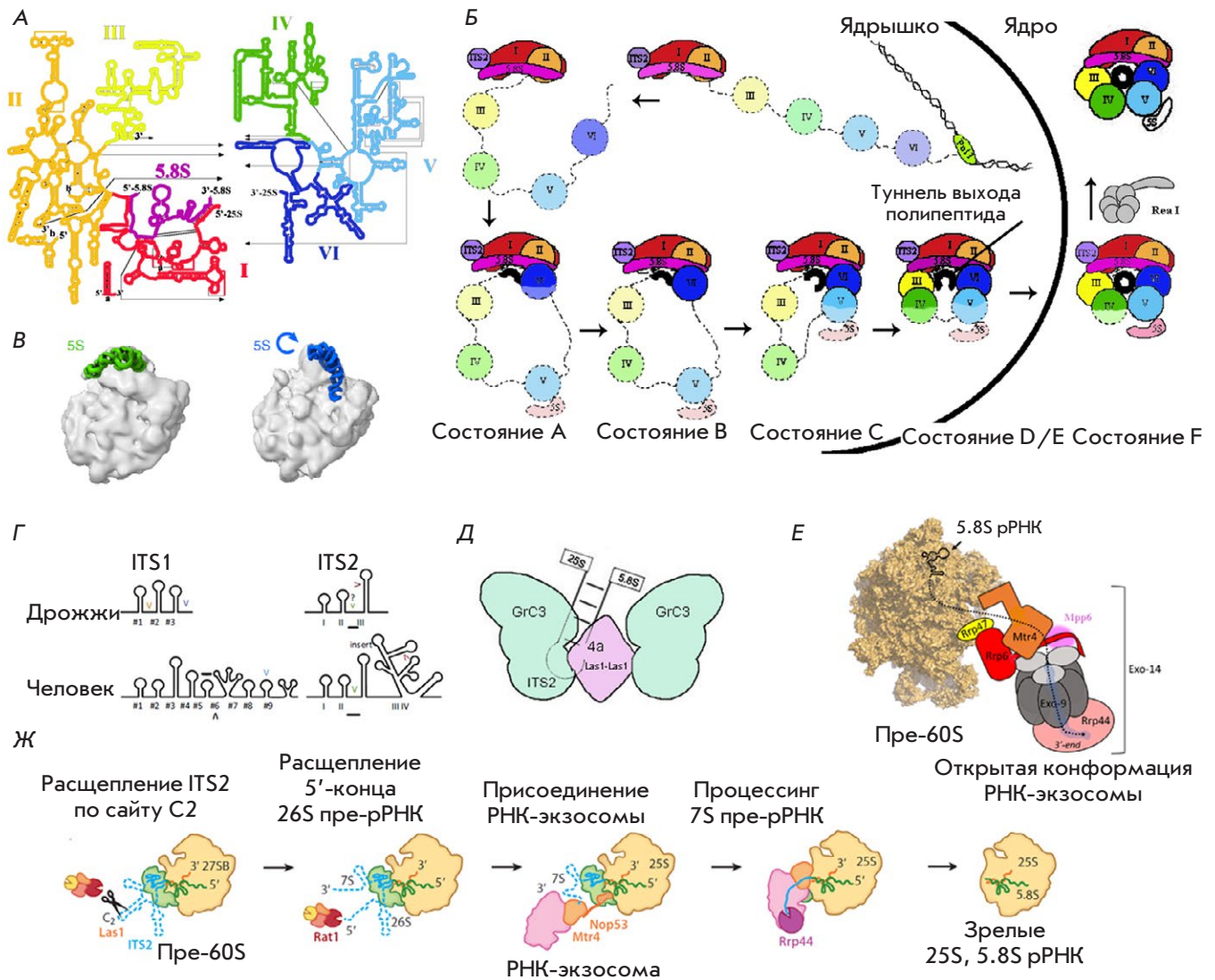
В первой части нашего обзора подробно описаны механизмы формирования и процессинга общего 90S предшественника, биогенез малой 40S субъединицы, а также ядрышко как специальная внутриядерная структура, необходимая для формирования и раннего созревания предшественников рибосом. Во второй части рассмотрение деталей биогенеза рибосом продолжено на примере формирования большой 60S субъединицы человека и дрожжей.

## БИОГЕНЕЗ ПРЕДШЕСТВЕННИКА СУБЪЕДИНИЦЫ 60S

25S рибосомная РНК (рРНК) 60S субъединицы дрожжей состоит из шести консервативных доменов (I–VI), которые более тесно переплетены друг с другом, чем домены 18S рРНК в малой субъединице (SSU) (рис. 1). На внешней поверхности большой субъединицы (LSU) расположены домены I и II 25S и 5.8S рРНК, а домены IV и V входят в состав функциональных центров. Домены III и IV соединяют малую и большую субъединицы. При этом домен III рРНК связывается с другими доменами рРНК в нижней части субъединицы 60S, 5.8S рРНК находится между доменами I и III, а 5S рРНК закреплена поверх доменов II и V (рис. 1). Домен VI связан с доменами I, II и 5.8S рРНК.

В 2017 году тремя группами исследователей были опубликованы крио-ЭМ-структуры высокого разрешения пре-60S из ядер дрожжей. В этих структурах идентифицированы шесть типов пре-60S частиц, различающихся плотностью упаковки РНК и составом рибосомных белков (RP) [1, 6–8] (рис. 1). Вторичная структура рРНК LSU разделена на шесть доменов, однако эти домены невозможно отчетливо выделить в 3D-структуре, в отличие от четырех доменов 18S рРНК в SSU. Домены I и II 25S рРНК в процессе транскрипции связывают 5.8S и ITS2, образуя структурный каркас для дальнейшей сборки (рис. 1) [1, 7, 8]. Домен VI, после того как РНК-полимераза I (Pol I) завершает его транскрипцию, сразу принимает упорядоченную структуру, в то время как центральные домены (III, IV и V) остаются неупорядоченными, взаимодействуя с факторами сборки рибосом (ФСР), которые препятствуют образованию контактов с 5'-концевыми доменами. В составе зрелой LSU домены I–V формируют туннель выхода пептида, II и VI – GTP-азный центр, а домен V – пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) с А- и Р-сайтами. Скоординированный процесс присоединения и диссоциации различных ФСР обеспечивает последовательное формирование этих ключевых структур.

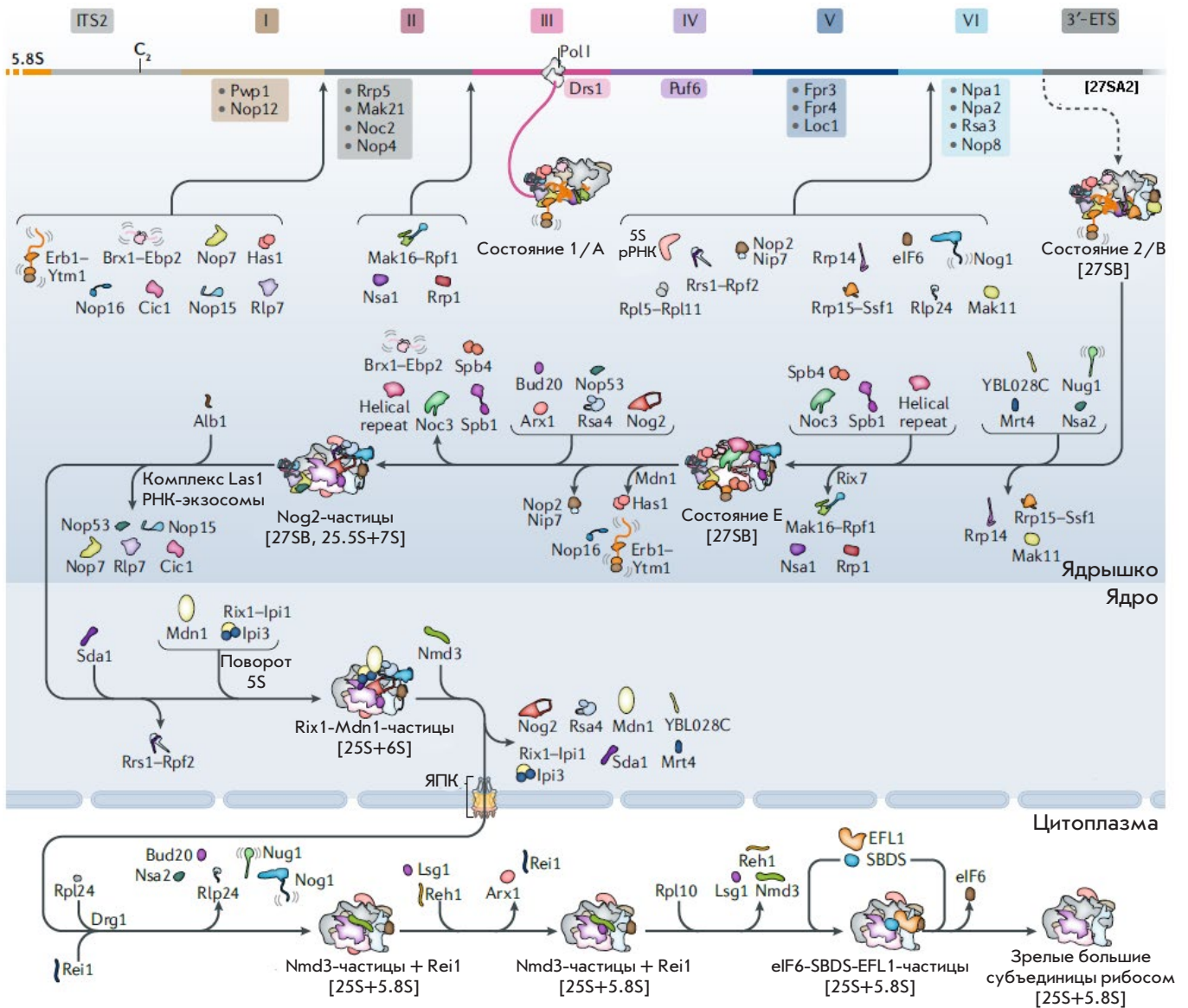




**Рис. 1.** Структура и созревание пре-рРНК дрожжей. А – 25S рРНК содержит шесть доменов (I–VI) вторичной структуры. 5.8S рРНК (показана черным) комплементарно взаимодействует с доменом I 25S рРНК (адаптировано из <https://crw-site.chemistry.gatech.edu/>). Б – последовательность сборки доменов пре-60S пре-рРНК. Цветовая кодировка доменов 25S рРНК соответствует панели (А). Присоединение рибосомных белков и факторов биогенеза к предшественнику 35S рРНК. Формирование туннеля выхода полипептида (черный кружок) начинается с того, что домен VI связывается с доменами I и II и с участком 5.8S предшественника рРНК. Складывание доменов рРНК осуществляется в следующем порядке: VI, V, III и IV. В состоянии F (конечном), домен V полностью свернут [1]. В – поворот 5S рРНК [2]. Г – схема вторичных структур ITS1 и ITS2 дрожжей и человека. Знаком «V» обозначены сайты расщепления. Предсказанные сайты отмечены знаками вопроса, подчеркнуты сайты связывания экзонуклеазы у человека [3]. Д – модель процессинга ITS2 РНКазой РНК [4]. Е – схема взаимодействия ядерной РНК-экзосомы с пре-60S [5]. Ж – удаление ITS2 из частицы пре-60S ферментами процессинга рРНК. Показаны промежуточные соединения, образующиеся во время удаления ITS2 [6]

Например, серия последовательных взаимодействий с ФСР (Nog1, Rei1 и Reh1), происходящих сразу после окончания формирования туннеля выхода полипептида, способствует завершению фолдинга [9–13]. Домен VI, который соответствует 3'-концу 25S рРНК, стабильно включается в основу частицы, замыкая кольцо рРНК и оставляя свободными домены III–V [1, 7, 8] (рис. 2). Они последовательно собираются во-

круг образующегося позднее туннеля выхода растущего полипептида, оставляя ПТЦ в незрелой конформации. Последовательность событий отличается от пути биогенеза 40S, где укладка рРНК происходит последовательно от 5'- к 3'-концу 18S рРНК. Примечательно, что предварительным условием для образования этих кольцеобразных промежуточных соединений рРНК в 60S субчастице является

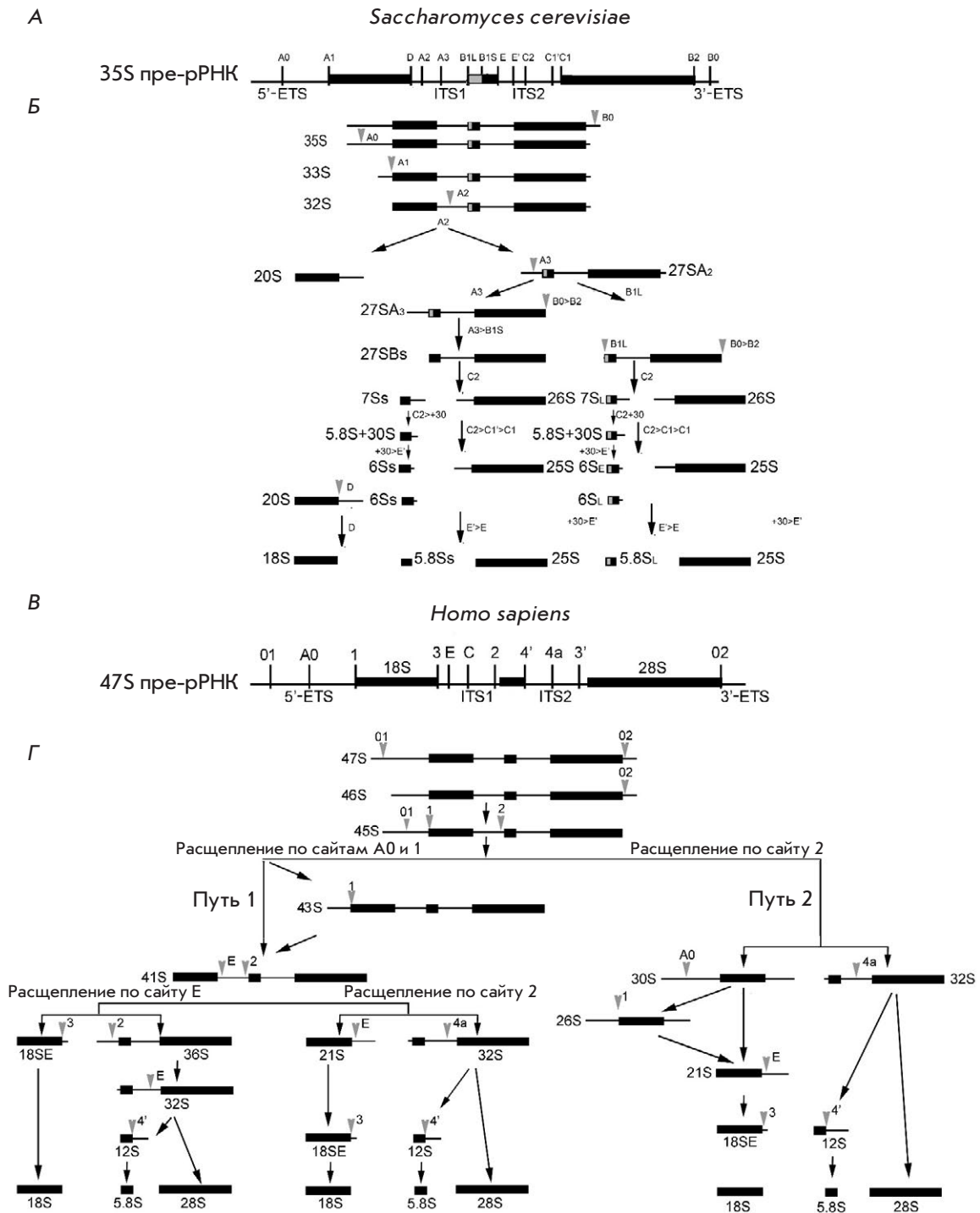


**Рис. 2.** Схема сборки большой субъединицы дрожжей. Показаны последовательные стадии созревания большой рибосомной субъединицы (60S), начиная с самых ранних стадий в ядрышке, через стадии в нуклеоплазме и, наконец, в цитоплазме. Показаны части рДНК, из которых образуются 5.8S рРНК, ITS2, домены I–VI 25S рРНК и 3'-ETS. Адаптировано из [14]. Факторы сборки и комплексы, структура которых известна, схематично изображены; если структуры не установлены, приведены их текстовые аббревиатуры

удаление внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (ITS1) и внешнего транскрибируемого спейсера – 3'-ETS (рис. 3), поскольку эти последовательности стерически препятствуют ассоциации домена VI рРНК с другими доменами. Кольцевой промежуточный продукт охватывает как 5'-, так и 3'-конец рРНК и может защищать рРНК от деградации, но не препятствует модификации гетероциклических оснований. Закрепление 5'- и 3'-концов, вероятно, облегчает сборку подвижных соседних доменов, формируя своеобразный каркас. Домен V особенно «выигрывает» от предварительной сборки других до-

менов рРНК, так как его участки должны сформировать контакты с несколькими доменами, включая 5S рРНК (рис. 1, 2). В ходе этого процесса конформация комплекса меняется трижды (рис. 1, 2).

Некоторые ФСР, такие, как Rrp5, Mak21, Noc2 и Nop4, по-видимому, способствуют уплотнению рРНК на самых ранних котранскрипционных стадиях биогенеза LSU, образуя жесткую опору для согласованного сворачивания РНК [14–19]. Структуры прерибосомных частиц мутантов с дефицитом этих ФСР имеют более рыхлую структуру [14, 18]. Ранние ФСР (Npa1, Npa2, Rsa3 и Nop8) и РНК-



**Рис. 3.** Схемы созревания транскрипта 35S пре-рРНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (А) и транскрипта 47S пре-рРНК человека (В). Три из четырех рРНК: 18S, 5.8S и 25S (у дрожжей)/28S (у человека) синтезируются Pol I в виде одного длинного транскрипта. Кодировующие последовательности «зрелых» рРНК окружают 5'-, 3'-ETS, ITS1 и ITS2 – некодирующие спейсеры. На схеме показано взаимное расположение известных и предсказанных сайтов расщепления. Процессинг пре-рРНК у почкующихся дрожжей (Б). Упрощенная схема процессинга пре-рРНК человека (Г). Первичный транскрипт, 47S пре-рРНК, первоначально расщепляется на обоих концах молекулы, по сайтам 01 и 02, образуя предшественник 45S, который процессируется по двум альтернативным путям [51]. «>» (например, C2> C1'> C1) обозначает последовательное укорачивание соответствующих 3'- или 5'-концов пре-рРНК с помощью нуклеаз



хеликазы Dbp6 образуют стабильный комплекс, который может выполнять структурную функцию [19, 20]. Шесть других РНК-хеликаз (Dbp2, Dbp3, Dbp7, Dbp9, Mak5 и Prp43) также необходимы на начальных этапах сборки, требующих ремоделирования структур РНК (для обзора см. [20, 21]). Интересно, что расщепление по A2 и A3 ITS1 связано с транскрипцией и процессингом последовательностей, удаленных друг от друга в первичной структуре на несколько тысяч нуклеотидов. Котранскрипционное расщепление в сайте A2 происходит, когда синтезированы домены I и II 25S рРНК [22, 23]. Гидролиз по A3 происходит после окончания транскрипции и процессинга 3'-ETS [24]. Возможно, в результате фолдинга РНК, опосредованного белками, формируются структуры, способные взаимодействовать с ФСР и нуклеазами. Например, связывание Rrp5 ITS1 как в процессоме SSU (сайт A2), так и в частицах пре-60S (сайт A3) [25–27] может регулировать расщепление в этих местах и координировать сборку обеих субчастиц [16, 18, 28, 29].

Ранние ядрышковые частицы пре-60S содержат приблизительно 30 ФСР и 30 рибосомных белков (табл. 1). Большинство из них, по-видимому, стабилизируют структуру, а часть обладает ферментативной активностью, которая может контролировать переход между ключевыми этапами в процессе сборки 60S. Например, факторы Nop2 и Spb1 важны для независимого от мякРНК метилирования РНК. Субстрат и функция хеликазы Has1 не установлены, как и функции GTP-аз Nog1 и Nug1, которые, вероятно, необходимы для высвобождения Nop2 и Spb1 из более поздних пре-60S субчастиц. Интересно, что белки семейства Brix вместе с белками-партнерами [31–34], по-видимому, сворачивают рРНК, соединяя вместе разные домены. Например, димер Ssf1–Rrp15 связывает домены III и VI рРНК; комплекс Vrx1–Ebp2 – стык доменов I и II. Rpf1–Mak16 контактирует с 5.8S рРНК и доменами I, II и VI. Белки семейства Brix, Rpf2 и Rrs1 взаимодействуют с 5S рРНК и доменом V в частице Nog2 пре-60S [13], а комплекс Imp4–Mpp10 связывает 5'-ETS и зарождающийся 3'-домен внутри частицы 90S.

Выделение пре-60S в комплексе с фактором Nsa1 позволило установить, что при образовании LSU комплекс Nsa1–Rpf1–Mak16–Rrp1 стабилизирует поверхность, контактирующую с растворителем; комплекс Rlp24–Nog1–Mrt4–Mak16–Tif6–Nsa2 взаимодействует преимущественно с доменами V и VI; а комплекс Nsa3–Nop15–Rlp3–Nop7–Erb1–Ytm1 организует ITS2 при формировании «стопы». Подобно нескольким ФСР 90S субчастицы, Erb1 имеет длинный N-конец, который «извивается» по поверхности пре-60S, контактируя с отдален-

ными факторами, включая димер Vrx1–Ebp2, хеликазу Has1, Nop16 и фактор «стопы» Nop7 [1, 7, 8]. Более того, β-пропеллерный домен Erb1 стабильно взаимодействует с фактором Ytm1, служащим субстратом АТФ-азы Rea1 [35]. На определенном этапе Rea1 создает механохимическую силу для удаления Ytm1 и расположенного в глубине структуры Erb1. Примечательно, что другие белковые комплексы содержат также белки (Nsa1, Rlp24), которые диссоциируют при помощи таких ААА-АТФ-аз, как Rix7 и Drg1 [35, 36].

Пока неясно, когда и как 5S РНП (5S рРНК, uL18/Rpl5, uL5/Rpl11) включается в самые ранние частицы пре-60S. Взаимодействие происходит с 5S РНП в свернутой конформации и, следовательно, требует конформационного поворота на 180° на более поздних этапах созревания 60S [6, 13, 37]. Эта стадия сочетается с формированием ПТЦ, правильность образования которого проверяется удалением Rsa4 с помощью огромной Rea1 ААА-АТФ-азы и GTP-зависимой диссоциации Nug2 [38, 39]. Связывание факторов ядерного экспорта с пре-60S и последующий транспорт происходят после преодоления контрольных точек качества сборки [39]. Несмотря на строгую систему контроля точности сборки в ядре, пре-60S частицы, содержащие ITS2 и связанные с ней факторы, могут попадать в цитоплазму и даже участвовать в трансляции [40–42].

### **Транспорт пре-60S в цитоплазму и контроль качества предшественников субъединиц**

Транспорт из ядрышка в нуклеоплазму сопровождается обменом белковыми факторами, которые способствуют ремоделированию и последующему экспорту предшественников из ядра. В цитоплазме рибосомы пре-60S проходят последние стадии созревания, включая удаление ФСР, присоединение нескольких последних RP и проверку качества функциональных центров.

Адаптерный белок Nmd3 с последовательностью ядерного экспорта контролирует взаимодействие экспортина Crm1/Xpo1 с субъединицей 60S, облегчая ее транспорт в цитоплазму [6, 43–46]. Обнаружено взаимодействие практически готовых 60S субъединиц с неканоническими факторами экспорта [6, 46].

В цитоплазме предшественник пре-40S, связываясь с несколькими ФСР, блокирующими доступ к каналу мРНК и Р-сайту связывания инициаторной тРНК, проходит контроль качества. Впоследствии при участии АТФ-азы Fab7 и фактора инициации трансляции эукариот 5В (eIF5B) 40S присоединяется к большой субъединице 60S, при этом GTP-азный центр eIF5B должен находиться в активной



Таблица 1. Факторы сборки большой субъединицы рибосом [20, 30]

Факторы биогенеза рибосом; компоненты LSU <i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
Номер кластера			<i>Homo sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Функция
8	8	4	PDCD11	Rrp5	Структурный
	4		RBM28	Nop4	Структурный
1			DDX51	Dbp6	DEAD-бокс-хеликаза
	1		DDX50	Dbp3	«
1	1		DDX31	Dbp7	«
1	4		DDX56	Dbp9	«
1	1		DDX24	Mak5	«
			DDX54	Dbp10	«
	2		GAR1	Gar1	Кофактор псевдоуридин-синтазы
2	2		NHP2	Nhp2	Кофактор псевдоуридин-синтазы
	8		NOP10	Nop10	Кофактор псевдоуридин-синтазы
6	6	6	DKC1	Cbf5	Псевдоуридин-синтаза
2	2	2	NOP56	Nop56	Основной компонент ВохС/Д мякРПП
			NOP58	Nop58	То же
2	2	2	FBL	Nop1	«
2	2	11	NHP2L1	Snu13	«
			KIAA0020	Puf6	Структурный
1			PWP1	Pwp1	Структурный
			RBM34	Nop12	Структурный
4	4	4	DDX27	Drs1	DEAD-бокс-хеликаза
6	11	11	PAK1IP1	Mak11	Структурный
			PPAN	Ssf1	«
			PPAN	Ssf2	«
4	4	4	RRP15	Rrp15	«
9	11		SURF6	Rrp14	«
4	4	4	WDR74	Nsa1	«
4	4	4	RRP1/NOP52	Rrp1	«
4	10	10	RPF1	Rpf1	«
4	4	4	MAK16	Mak16	«
			NVL	Rix7	AAA-АТФ-аза
4	4	4	EBNA1BP2	Ebp2	Структурный
4	4	4	BRX1	Brx1	«
4	4	4	BOP1	Erb1	«
		4	WDR12	Ytm1	«
8	8	8	DDX18	Has1	DEAD-бокс-хеликаза
4	4	11	NOC2L	Noc2	Структурный
1			FTSJ3	Spb1	рРНК-метилаза
			DDX55	Spb4	DEAD-бокс-хеликаза
1			NOP2	Nop2	рРНК-метилаза
1			NIP7	Nip7	Структурный
			NOC3L	Noc3	«
4	4	4	PES1	Nop7	«
4	4	4	MKI67IP	Nop15	«
				Cic1	«
	8		eIF6	eIF6	«
11	11	11	GLTSCR2	Nop53	Структурный, связывание РНК. Экзосомы
2			RSL24D1	Rlp24	Структурный
4	4	4	GTPBP4	Nog1	GTP-аза
			MRTO4	Mrt4	Структурный
4	1	1	NSA2	Nsa2	Структурный
1			GNL3	Nug1	GTP-аза
11		11	RRS1	Rrs1	Структурный
		1	RPF2	Rpf2	Структурный
11		11	GNL2	Nog2	GTP-аза
			NLE1	Rsa4	Структурный
			WDR18	Ipi3	Структурный
			MDN1	Mdn1	AAA-АТФ-аза
11	11		SDAD1	Sda1	Структурный
Частицы, содержащие Nmd3					
2			NMD3	Nmd3	«
		2	ZNF622	Rei1	«
			ZNF622	Reh1	«
	6		LSG1	Lsg1	АТФ-аза

конформации. Образование комплекса гарантирует способность зрелой 40S обеспечивать гидролиз GTP. Формирование зрелого 3'-конца 18S рРНК эндонуклеазой Nob1 сопровождается диссоциацией оставшихся ФСП от 40S, диссоциацией комплекса 40S и 60S, что сигнализирует о готовности малой субчастицы к финальной стадии процессинга [12, 47–49].

### Биогенез рибосом у человека гораздо сложнее, чем у дрожжей

Основные этапы и молекулярные события биогенеза рибосом консервативны. Долгое время считалось, что большинство стадий образования субъединиц в клетках человека и *Saccharomyces cerevisiae* одинаковы, но это оказалось сильным упрощением ситуации. Ядрышки человека имеют три отдела, а не два, как у дрожжей, они участвуют в большем числе клеточных процессов [50, 51] и содержат по меньшей мере в 20 раз больше белков, чем у дрожжей (до 300 у дрожжей; 6000 у человека) [52]. Сложность физиологических процессов у многоклеточных организмов определяет потребность в новых способах регуляции формирования рибосом, о чем свидетельствует, например, зависимость синтеза 40S субъединиц у мышей от циркадных ритмов [53, 54].

Рибосомы человека имеют больший размер, чем рибосомы дрожжей. Они содержат больше рибосомных белков, которые нередко крупнее дрожжевых. рРНК человека сравнимы по размеру с дрожжевыми за исключением 28S рРНК, которая в 1.5 раза больше. Наиболее значительно различаются размеры ETS и ITS: у человека они содержат много моно- и динуклеотидных повторов, которые, возможно, возникли вследствие ошибок репликации. Усложнение структуры рибосом высших эукариот и, соответственно, рРНК неизбежно влияет на биогенез рибосом [26], что выражается в появлении большего числа предшественников [55]. Биогенез 40S субчастиц человека сопровождается образованием минимум двух дополнительных предшественников, содержащих 30S и 21S пре-рРНК (рис. 3) [15, 56]. У дрожжей 70–80% зарождающихся транскриптов пре-рРНК подвергаются котранскрипционному расщеплению в ITS1, в то время как у млекопитающих первичный транскрипт почти всегда расщепляется посттранскрипционно [23, 57]. Показано, что процессинг ITS1 в клетках человека происходит сложнее, чем в клетках дрожжей, и нуждается как в эндо-, так и в экзонуклеолитической активности [57–59].

Отличительной чертой биогенеза эукариотических рибосом является модульная сборка прерибосомных комплексов. Как у дрожжей, так и у человека UTP-A, UTP-B и UTP-C, а также мякРНК U3, гетеродимеры RCL1–BMS1 и комплексы IMP3–

IMP4–MPP10 и EMG1 собираются на вновь синтезируемом пре-рРНК-транскрипте и образуют ядро так называемой процессомы SSU. Сходным образом некоторые комплексы, такие, как PeBoW человека (Nop7–Erb1–Ytm1 у дрожжей) [60] и PELP1–TEX10–WDR18 (Rix1–Ipi3–Ipi1 у дрожжей) [61], действуют во время биогенеза пре-60S субчастиц. Несмотря на эволюционную консервативность, их состав различается у разных видов; у человека выявлено несколько дополнительных РНК-хеликаз, например, DDX21 для UTP-B и DDX27 для PeBoW [62, 63]. Все это указывает на дополнительные стадии ремоделирования на ранних стадиях сборки прерибосом у человека.

Продукция 18S рРНК в клетках млекопитающих может происходить в условиях подавления синтеза 28S рРНК [64–67]. Дефицит нескольких рибосомных белков LSU человека [57] не препятствует образованию как 18S рРНК, так и ее прямого предшественника – 18S-E пре-рРНК, несмотря на серьезное снижение эффективности синтеза 28S рРНК. Эти данные подтверждают модель, согласно которой ранние этапы сборки каждой рибосомной субчастицы контролируют проксимальное расщепление в ITS1. Примечательно, что этот способ расщепления предшественников SSU и LSU не исключает существования факторов, которые могут участвовать в обоих расщеплениях ITS1. В клетках млекопитающих разделение предшественников SSU и LSU происходит одновременно, что затрудняет анализ стадий процессинга. Дефицит различных факторов сборки SSU и LSU мышцы приводит к ингибированию одного из двух расщеплений ITS1 [68]. Существует гипотеза, согласно которой расщепление в двух сайтах ITS1 пре-рРНК мышцы, соответствующих сайтам E и C у человека, скоординированы с ранними этапами сборки SSU или LSU. В результате этого каждая субчастица остается прикрепленной к ITS1 до тех пор, пока не достигнет стадии созревания, готовой к отщеплению ITS1 [68].

В отсутствие ряда факторов сборки LSU ингибирует расщепление в сайте A2, что приводит к накоплению аберрантных 35S пре-рРНК [69–71] и остановке процессинга. В отличие от дрожжей, в клетках млекопитающих расщепление транскрипта происходит в любом из двух сайтов, расположенных в ITS1, что приводит к генерации основных предшественников, которые созревают до 18S и 5.8S/28S рРНК (рис. 3). Дефекты ранних этапов сборки LSU в клетках млекопитающих ингибируют расщепление в 3'-области ITS1. Разделение РНК рибосомных субчастиц у млекопитающих включает расщепление ITS1 в двух сайтах, в отличие от одного у дрожжей.

Информации о структуре прерибосом человека очень мало, потому что не существует надежных методов их выделения и очистки. Идентификация факторов синтеза рибосом человека стала возможной только при проведении высокопроизводительных скринингов на основе малых интерферирующих РНК, которые позволяют выявить дефекты продукции промежуточных звеньев пре-рРНК, накопление рибосом или компонентов прерибосом в ядрышке или нуклеоплазме [30, 72]. Такой скрининг позволил идентифицировать 286 белков, включая ортологи ФСР дрожжей, а также 74 специфичных для человека белка и мякРНК, которые, возможно, являются ФСР [30, 73] (табл. 1). Недавно с помощью скрининга факторов, влияющих на количество или морфологию ядрышек, обнаружили 139 потенциальных ФСР [74]. Однако роль отдельных ФСР человека практически не изучена. Состав, активность и структура промежуточных комплексов также изучены недостаточно, потому что большинство данных получено путем экстраполяции данных анализа прерибосом дрожжей. В ряде случаев функции даже гомологичных факторов синтеза рибосом могут различаться, например, *Nip7* и *Spb1* дрожжей необходимы для созревания 5.8S и 25S рРНК, а их гомологи – *NIP7* и *FTSJ3* человека – участвуют в синтезе 18S рРНК [75]. Отдельную проблему представляет сложность идентификации ФСР, которые непосредственно участвуют в сборке субчастиц, и их отличия от белков/сигнальных путей, которые опосредованно влияют на продукцию рибосом.

Проведен высокопроизводительный скрининг функций ядрышковых белков человека путем снижения их уровня с помощью малых интерферирующих РНК. Результаты этого скрининга позволяют разделить белки ядрышка на 12 функциональных кластеров в зависимости от их влияния на определенные стадии процессинга пре-рРНК. В разных типах клеток, включая первичные клеточные линии, наблюдали возникновение сходных дефектов [30]. Например, клетки с дефицитом *UTP18* накапливают aberrантную 34S пре-рРНК, что обусловлено ингибированием реакций раннего расщепления предшественника рРНК (в сайтах 01, A0 и 1). Клетки, лишенные *RPS11*, накапливают значительные количества 30S пре-рРНК из-за отсутствия процессинга в сайтах A0 и 1. *NOL9* в первую очередь участвует в процессинге *ITS2*, так как 32S пре-рРНК накапливается в отсутствие этого белка. 43S и 26S пре-рРНК обнаруживают в больших количествах в клетках с дефицитом *RPS3*, чем в контрольных клетках, указывая на участие этого белка в расщеплении сайтов A0 и 1. В клетках, лишенных *RPS3*, накапливается укороченная версия 21S – 21S-C (рис. 3).

Белки *MDN1*, *NVL2* и *AFGH2* человека являются гомологами трех дрожжевых AAA-АТФ-аз (*Rea1/Mdn1*, *Rix7*, *Drg1* соответственно), участвующих в высвобождении специфических факторов биогенеза пре-60S субчастиц [76]. Присутствие *MDN1* в комплексах пре-60S и *PELP1-TEX10-WDR18* (комплекс *Rix1* в дрожжах) позволяет предположить, что этот фермент выполняет сходные функции у разных организмов – от дрожжей до человека [77]. Общие роли играют также некоторые РНК-хеликазы. Например, *Dhr1* дрожжей и *DHX37* человека опосредуют высвобождение мякРНК U3 [78–81]. При этом у нескольких РНК-хеликаз человека выявлены дополнительные функции, связанные с биогенезом рибосом. Например, *DDX51* требуется для высвобождения специфичной для многоклеточных мякРНК U8 из комплексов пре-LSU [82], а *DDX21* координирует процессинг пре-рРНК с транскрипцией, облегчая доступ «поздних» мякРНК пре-40S к комплексам [63, 78, 83].

В клетках человека идентифицированы несколько новых прерибосомных мини-комплексов [82]. Так, антиапоптотический фактор транскрипции *AATF*, нейрогидин (*NGDN*) и *NOL10* образуют ядрышковый подкомплекс (*ANN*) [84]. Эти белки взаимодействуют с ранними прерибосомами, а отсутствие любого из компонентов *ANN* приводит к нарушению расщепления пре-рРНК на ранних стадиях биогенеза. *XND*, ядрышковый комплекс, состоящий из *NF-kB*-репрессирующего фактора (*NKRF*), РНК-хеликазы *DHX15* и 5'-3'-экзонуклеазы *XRN2*, также участвует в ранних стадиях сборки рибосом человека [85]. *NKRF* рекрутирует *XRN2* в прерибосомные комплексы, где он принимает участие в процессинге пре-рРНК и удалении вырезанных фрагментов пре-рРНК. *NKRF* также стимулирует АТФ-азную и хеликазную активность *DHX15* [85], т.е., по-видимому, эти белки совместно функционируют на ранней стадии ремоделирования пре-рРНК. Дрожжевой гомолог *DHX15*, *Prp43*, участвует в высвобождении мякРНК из частиц пре-60S и способствует расщеплению 3'-конца 18S рРНК [86, 87]. Фактор транскрипции, гетеродимер *NF45-NF90*, связывает двухцепочечную РНК в составе пре-60S. Отсутствие этих факторов, хотя и не влияет на процессинг рРНК, но вызывает изменения морфологии ядрышек и накопление пре-60S-комплексов [88].

Недавно в лаборатории Бекмана определили крио-ЭМ-структуры поздних ядерных и цитоплазматических комплексов пре-40S субчастиц человека [89]. Структура одного из промежуточных состояний позволила выявить положение фактора биогенеза *RRP12* и двух метилтрансфераз (*BUD23* и *TRM112*) в голове 40S субчастицы. Более поздняя цитоплаз-

матическая пре-40S частица человека очень сходна с пре-40S дрожжей с консервативными ФСР в идентичных положениях. Таким образом, структура пре-40S и последние стадии механизма процессинга 18S рРНК являются эволюционно консервативными [89].

### **Рибосомные белки и их роль в формировании структуры рРНК и созревающих субчастиц**

Основная роль рибосомных белков заключается в поддержании структуры и функции рибосом, а также продукции активных рибосом. Математическое моделирование показало фундаментальное преимущество сборки сложных комплексов, в частности рибосом, из многочисленных некрупных рибосомных белков, а не из небольшого числа более крупных полипептидов [90]. Известно, что большинство человеческих РР представлены в единственном варианте, а многие РР дрожжей имеют две изоформы. Удивительно, но ~50% транскриптов, которые синтезирует РНК-полимераза II человека, – это мРНК РР [91], и концентрация 80 РР в клетке тщательно поддерживается на уровне, оптимальном для сборки рибосом. Большинство генов РР имеют один или несколько общих промоторных элементов (GABP, Sp1, YY1) для синхронизации транскрипции. мРНК всех РР содержат 5'-концевую олигопиримидиновый тракт (5'-ТОР), что позволяет также корегулировать их трансляцию [92]. Рибосомные белки, как правило, положительно заряжены, склонны к агрегации и деградации. Шапероны, связываясь (часто котрансляционно) с вновь синтезируемыми РР, стабилизируют их, а также облегчают импорт в ядро и присоединение к прерибосомным комплексам [93, 94]. В клетках человека найдены гомологи многих шаперонов РР дрожжей – это белки Vcp1/BCCIP, Syo1/HEATR3, Rrb1/GRWD1, Sgt1/AMMP и Tsr2/TSR2. В то же время другие, например Acl4 и Yar1, у многоклеточных организмов, по-видимому, не сохранились [78, 93, 95–98]. Примечательно, что рибосомные белки RPL5 (uL18) и RPL11 (uL5) связываются с прерибосомами в виде подкомплекса вместе с 5S рРНК [99]. Пре-5S рРНК синтезируется с помощью РНК-полимеразы III, и для созревания ее 3'-конца необходимы экзонуклеазы REX1, REX2 и REX3, а также RPL5 [100–102]. Как у дрожжей, так и у человека Rrs1/RRS1 и Rpf2/BXDC1 необходимы для интеграции 5S РНП в комплексы пре-60S, а белок-супрессор опухолей PICT1/GLTSCR2 является дополнительным фактором в клетках человека [102, 103]. Взаимодействие многих РР с прерибосомами изначально нестабильно, но правильное сворачивание и образование третичных структур в рРНК постепенно приводит к стабильному включению их в рибосомные комплексы. Фундаментальной особенностью сборки рибосом,

которая сохраняется не только у эукариот, но происходит также в ходе синтеза прокариотических рибосом [104], является иерархическое включение РР, что способствует последовательной организации отдельных доменов субъединиц. Сначала белки 5'-, центрального и 3'-минорного доменов 18S рРНК формируют «тело» SSU, а затем происходит сборка «головы» и «клюва» [105]. Точно так же РР, находящиеся на поверхности LSU, которая контактирует с растворителем, включаются в структуру на первых этапах сборки, а белки, которые связываются с межсубъединичным интерфейсом и с центральным протуберанцем, встраиваются позже [106]. Универсальный характер иерархического порядка включения РР предполагает, что пошаговая сборка, стабилизация и уплотнение различных доменов рибосомных субчастиц являются важным механизмом, который помогает обеспечить правильность продвижения по пути сборки.

### **ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

На протяжении многих лет сложный путь биогенеза эукариотической рибосомы изучали по большей части на клетках дрожжей, где простота генетических манипуляций в сочетании с возможностью выделения большого количества прерибосомных комплексов для композиционного и структурного анализа позволили получить большое количество данных о фундаментальных аспектах сборки рибосом. Недавние исследования подтверждают, что многие этапы сборки рибосом у дрожжей и человека схожи, а возникающие различия дают важную информацию о конкретных стадиях биогенеза, которые адаптировались в ходе эволюции. Хотя обнаружено множество факторов, необходимых для биогенеза рибосом человека, вполне вероятно, что перечень ФСР будет значительно расширен. Основные задачи заключаются в том, чтобы определить, какие из факторов, необходимых для синтеза рибосом, непосредственно связаны с прерибосомными комплексами, и проанализировать отдельные роли таких белков во время сборки субъединиц. Недавно полученные крио-ЭМ-структуры прерибосом дрожжей предоставили огромное количество информации о временном порядке, распределении и молекулярных функциях многих ФСР. Структурный анализ прерибосом должен значительно улучшить наше понимание сборки рибосом человека. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00796 А «Анализ белково-нуклеинового состава интермедиатов сборки рибосомных субчастиц в генетически модифицированных клетках человека».*



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kater L., Thoms M., Barrio-Garcia C., Cheng J., Ismail S., Ahmed Y.L., Bange G., Kressler D., Berninghausen O., Sinning I., et al. // *Cell*. 2017. V. 171. № 7. P. 1599–1610.
2. Thoms M., Mitterer V., Kater L., Falquet L., Beckmann R., Kressler D., Hurt E. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 1–13.
3. Coleman A.W. // *Trends Genet.* 2015. V. 31. № 3. P. 157–163.
4. Pillon M.C., Hsu A.L., Krahn J.M., Williams J.G., Goslen K.H., Sobhany M., Borgnia M.J., Stanley R.E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019. V. 26. № 9. P. 830–839.
5. Pillon M.C., Lo Y.-H., Stanley R.E. // *DNA Repair (Amst.)*. 2019. V. 81. e102653.
6. Baßler J., Hurt E. // *Annu. Rev. Biochem.* 2019. V. 88. № 1. P. 281–306.
7. Zhou D., Zhu X., Zheng S., Tan D., Dong M.-Q., Ye K. // *Protein Cell*. 2019. V. 10. № 2. P. 120–130.
8. Sanghai Z.A., Miller L., Molloy K.R., Barandun J., Hunziker M., Chaker-Margot M., Wang J., Chait B.T., Klinge S. // *Nature*. 2018. V. 556. № 7699. P. 126–129.
9. Greber B.J., Gerhardy S., Leitner A., Leibundgut M., Salem M., Boehringer D., Leulliot N., Aebersold R., Panse V.G., Ban N. // *Cell*. 2016. V. 164. № 1–2. P. 91–102.
10. Ma C., Wu S., Li N., Chen Y., Yan K., Li Z., Zheng L., Lei J., Woolford J.L., Gao N. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. № 3. P. 214–220.
11. Greber B.J., Boehringer D., Montellese C., Ban N. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 12. P. 1228–1233.
12. Correll C.C., Bartek J., Dundr M. // *Cells*. 2019. V. 8. № 8. e869.
13. Wu S., Tutuncuoglu B., Yan K., Brown H., Zhang Y., Tan D., Gamalinda M., Yuan Y., Li Z., Jakovljevic J., et al. // *Nature*. 2016. V. 534. № 7605. P. 133–137.
14. Klinge S., Woolford J.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 20. № 2. P. 116–131.
15. Mullineux S.-T., Lafontaine D.L.J. // *Biochimie*. 2012. V. 94. № 7. P. 1521–1532.
16. Venema J., Tollervey D. // *EMBO J*. 1996. V. 15. № 20. P. 5701–5714.
17. Young C.L., Karbstein K. // *RNA*. 2011. V. 17. № 3. P. 512–521.
18. Lebaron S., Segerstolpe Å., French S.L., Dudnakova T., de Lima Alves F., Granneman S., Rappsilber J., Beyer A.L., Wieslander L., Tollervey D. // *Mol. Cell*. 2013. V. 52. № 5. P. 707–719.
19. Granneman S., Petfalski E., Tollervey D. // *EMBO J*. 2011. V. 30. № 19. P. 4006–4019.
20. Sloan K.E., Bohnsack M.T. // *Trends Biochem. Sci.* 2018. V. 43. № 4. P. 237–250.
21. Rodríguez-Galán O., García-Gómez J.J., De la Cruz J. // *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* 2013. V. 1829. № 8. P. 775–790.
22. Turowski T.W., Tollervey D. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2015. V. 6. № 1. P. 129–139.
23. Koš M., Tollervey D. // *Mol. Cell*. 2010. V. 37. № 6. P. 809–820.
24. Allmang C., Tollervey D. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 278. № 1. P. 67–78.
25. Chaker-Margot M., Hunziker M., Barandun J., Dill B.D., Klinge S. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. V. 22. № 11. P. 920–923.
26. Zhang L., Wu C., Cai G., Chen S., Ye K. // *Genes Dev*. 2016. V. 30. № 6. P. 718–732.
27. Barandun J., Chaker-margot M., Hunziker M., Molloy K.R., Chait B.T., Klinge S. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. № 11. P. 944–953.
28. Eppens N.A., Rensen S., Granneman S., Raué H.A., Venema J. // *RNA*. 1999. V. 5. № 6. P. 779–793.
29. Hierlmeier T., Merl J., Sauert M., Perez-Fernandez J., Schultz P., Bruckmann A., Hamperl S., Ohmayer U., Rachel R., Jacob A., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 2. P. 1191–1210.
30. Tafforeau L., Zorbas C., Langhendries J.-L., Mullineux S.-T., Stamatopoulou V., Mullier R., Wacheul L., Lafontaine D.L.J. // *Mol. Cell*. 2013. V. 51. № 4. P. 539–551.
31. Madru C., Lebaron S., Blaud M., Delbos L., Pipoli J., Pasmant E., Réty S., Leulliot N. // *Genes Dev*. 2015. V. 29. № 13. P. 1432–1446.
32. Baßler J., Ahmed Y.L., Kallas M., Kornprobst M., Calviño F.R., Gnädig M., Thoms M., Stier G., Ismail S., Kharde S., et al. // *Protein Sci.* 2017. V. 26. № 2. P. 327–342.
33. Asano N., Kato K., Nakamura A., Komoda K., Tanaka I., Yao M. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 9. P. 4746–4757.
34. Kharde S., Calviño F.R., Gumiero A., Wild K., Sinning I. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 14. P. 7083–7095.
35. Baßler J., Kallas M., Pertschy B., Ulbrich C., Thoms M., Hurt E. // *Mol. Cell*. 2010. V. 38. № 5. P. 712–721.
36. Hiraishi N., Ishida Y., Sudo H., Nagahama M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 495. № 1. P. 116–123.
37. Leidig C., Thoms M., Holdermann I., Bradatsch B., Berninghausen O., Bange G., Sinning I., Hurt E., Beckmann R. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3491–3499.
38. Baßler J., Paternoga H., Holdermann I., Thoms M., Granneman S., Barrio-Garcia C., Nyarko A., Stier G., Clark S.A., Schraivogel D., et al. // *J. Cell Biol.* 2014. V. 207. № 4. P. 481–498.
39. Matsuo Y., Granneman S., Thoms M., Manikas R.G., Tollervey D., Hurt E. // *Nature*. 2014. V. 505. № 7481. P. 112–116.
40. Sarkar A., Thoms M., Barrio-Garcia C., Thomson E., Flemming D., Beckmann R., Hurt E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. № 12. P. 1107–1115.
41. Biedka S., Micic J., Wilson D., Brown H., Diorio-Toth L., Woolford J.L. // *J. Cell Biol.* 2018. V. 217. № 7. P. 2503–2518.
42. Rodríguez-Galán O., García-Gómez J.J., Kressler D., de la Cruz J. // *RNA Biol.* 2015. V. 12. № 8. P. 838–846.
43. Thomas F., Kutay U. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. № 12. P. 2409–2419.
44. Trotta C.R., Lund E., Kahan L., Johnson A.W., Dahlberg J.E. // *EMBO J*. 2003. V. 22. № 11. P. 2841–2851.
45. Gadal O., Strauß D., Kessl J., Trumppower B., Tollervey D., Hurt E. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. № 10. P. 3405–3415.
46. Nerurkar P., Altvater M., Gerhardy S., Schütz S., Fischer U., Weirich C., Panse V.G. // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2015. V. 319. P. 107–140.
47. Ghalei H., Trepreau J., Collins J.C., Bhaskaran H., Strunk B.S., Karbstein K. // *Mol. Cell*. 2017. V. 67. № 6. P. 990–1000.
48. Lebaron S., Schneider C., van Nues R.W., Swiatkowska A., Walsh D., Böttcher B., Granneman S., Watkins N.J., Tollervey D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 8. P. 744–753.
49. Strunk B.S., Novak M.N., Young C.L., Karbstein K. // *Cell*. 2012. V. 150. № 1. P. 111–121.
50. Hernandez-Verdun D., Roussel P., Thiry M., Sirri V., Lafontaine D.L.J. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2010. V. 1. № 3. P. 415–431.
51. Boisvert F.-M., van Koningsbruggen S., Navascués J., Lamond A.I. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 7. P. 574–585.
52. Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K.L., Ong S.-E., Lyon C.E., Lamond A.I., Mann M. // *Nature*. 2005. V. 433. № 7021.

- P. 77–83.
53. Preußner M., Heyd F. // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2016. V. 468. № 6. P. 983–991.
54. Sinturel F., Gerber A., Mauvoisin D., Wang J., Gatfield D., Stubblefield J.J., Green C.B., Gachon F., Schibler U. // *Cell.* 2017. V. 169. № 4. P. 651–663.
55. Fernández-Pevida A., Kressler D., de la Cruz J. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2015. V. 6. P. 191–209.
56. Stepiński D. // *Histochem. Cell Biol.* 2018. V. 150. № 6. P. 607–629.
57. Carron C., O'Donohue M.F., Choessel V., Faubladiet M., Gleizes P.E. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 1. P. 280–291.
58. Preti M., O'Donohue M.F., Montel-Lehry N., Bortolin-Cavaillé M.L., Choessel V., Gleizes P.E. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 8. P. 4709–4723.
59. Sloan K.E., Mattijssen S., Lebaron S., Tollervey D., Pruijn G.J.M., Watkins N.J. // *J. Cell Biol.* 2013. V. 200. № 5. P. 577–588.
60. Hölzel M., Rohrmoser M., Schlee M., Grimm T., Harasim T., Malamoussi A., Gruber-Eber A., Kremmer E., Hiddemann W., Bornkamm G.W., et al. // *J. Cell Biol.* 2005. V. 170. № 3. P. 367–378.
61. Finkbeiner E., Haindl M., Muller S. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 6. P. 1067–1078.
62. Kellner M., Rohrmoser M., Forné I., Voss K., Burger K., Mühl B., Gruber-Eber A., Kremmer E., Imhof A., Eick D. // *Exp. Cell Res.* 2015. V. 334. № 1. P. 146–159.
63. Sloan K.E., Leisegang M.S., Doebele C., Ramírez A.S., Simm S., Saffertal C., Kretschmer J., Schorge T., Markoutsas S., Haag S., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 1. P. 553–564.
64. Lapik Y.R., Fernandes C.J., Lau L.F., Pestov D.G. // *Mol. Cell.* 2004. V. 15. № 1. P. 17–29.
65. Strezoska Ž., Pestov D.G., Lau L.F. // *Mol. Cell Biol.* 2000. V. 20. № 15. P. 5516–5528.
66. Strezoska Z., Pestov D.G., Lau L.F. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 33. P. 29617–29625.
67. Robledo S., Idol R.A., Crimmins D.L., Ladenson J.H., Mason P.J., Bessler M. // *RNA.* 2008. V. 14. № 9. P. 1918–1929.
68. Wang M., Anikin L., Pestov D.G. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 17. P. 11180–11191.
69. Saveanu C., Namane A., Gleizes P.-E., Lebreton A., Rousselle J.-C., Noaillac-Depeyre J., Gas N., Jacquier A., Fromont-Racine M. // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. № 13. P. 4449–4460.
70. Talkish J., Campbell I.W., Sahasranaman A., Jakovljevic J., Woolford J.L. // *Mol. Cell Biol.* 2014. V. 34. № 10. P. 1863–1877.
71. Kallstrom G., Hedges J., Johnson A. // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. № 12. P. 4344–4355.
72. Badertscher L., Wild T., Montellese C., Alexander L.T., Bammert L., Sarazova M., Stebler M., Csucs G., Mayer T.U., Zamboni N., et al. // *Cell Rep.* 2015. V. 13. № 12. P. 2879–2891.
73. Nieto B., Gaspar S.G., Moriggi G., Pestov D.G., Bustelo X.R., Dosil M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 156–173.
74. Farley-Barnes K.I., McCann K.L., Ogawa L.M., Merkel J., Surovtseva Y.V., Baserga S.J. // *Cell Rep.* 2018. V. 22. № 7. P. 1923–1934.
75. Morello L.G., Coltri P.P., Quaresma A.J.C., Simabuco F.M., Silva T.C.L., Singh G., Nickerson J.A., Oliveira C.C., Moore M.J., Zanchin N.I.T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. e29174.
76. Kressler D., Hurt E., Bergler H., Baßler J. // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* 2012. V. 1823. № 1. P. 92–100.
77. Raman N., Weir E., Müller S. // *Mol. Cell.* 2016. V. 64. № 3. P. 607–615.
78. Bohnsack K.E., Bohnsack M.T. // *EMBO J.* 2019. V. 38. № 13. e100278.
79. Choudhury P., Hackert P., Memet I., Sloan K.E., Bohnsack M.T. // *RNA Biol.* 2019. V. 16. № 1. P. 54–68.
80. Sardana R., Liu X., Granneman S., Zhu J., Gill M., Papoulas O., Marcotte E.M., Tollervey D., Correll C.C., Johnson A.W. // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. № 2. e1002083.
81. Martin R., Straub A.U., Doebele C., Bohnsack M.T. // *RNA Biol.* 2013. V. 10. № 1. P. 4–18.
82. Srivastava L., Lapik Y.R., Wang M., Pestov D.G. // *Mol. Cell Biol.* 2010. V. 30. № 12. P. 2947–2956.
83. Calo E., Flynn R.A., Martin L., Spitale R.C., Chang H.Y., Wysocka J. // *Nature.* 2015. V. 518. № 7538. P. 249–253.
84. Bammert L., Jonas S., Ungricht R., Kutay U. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 20. P. 9803–9820.
85. Memet I., Doebele C., Sloan K.E., Bohnsack M.T. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 9. P. 5359–5374.
86. Bohnsack M.T., Martin R., Granneman S., Ruprecht M., Schleiff E., Tollervey D. // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. № 4. P. 583–592.
87. Pertschy B., Schneider C., Gnädig M., Schäfer T., Tollervey D., Hurt E. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 50. P. 35079–35091.
88. Wandrey F., Montellese C., Koos K., Badertscher L., Bammert L., Cook A.G., Zemp I., Horvath P., Kutay U. // *Mol. Cell Biol.* 2015. V. 35. № 20. P. 3491–3503.
89. Ameismeier M., Cheng J., Berninghausen O., Beckmann R. // *Nature.* 2018. V. 558. № 7709. P. 249–253.
90. Reuveni S., Ehrenberg M., Paulsson J. // *Nature.* 2017. V. 547. № 7663. P. 293–297.
91. Li B., Nierras C.R., Warner J.R. // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 8. P. 5393–5404.
92. Mayer C., Grummt I. // *Oncogene.* 2006. V. 25. P. 6384–6391.
93. Pillet B., Mitterer V., Kressler D., Pertschy B. // *BioEssays.* 2017. V. 39. № 1. P. 1–12.
94. Landry-Voyer A.M., Bergeron D., Yague-Sanz C., Baker B., Bachand F. // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № 22. P. 12900–12916.
95. Pausch P., Singh U., Ahmed Y.L., Pillet B., Murat G., Altegoer F., Stier G., Thoms M., Hurt E., Sinning I., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. e7494.
96. Pillet B., García-Gómez J.J., Pausch P., Falquet L., Bange G., de la Cruz J., Kressler D. // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. № 10. e1005565.
97. Schütz S., Fischer U., Altvater M., Nerurkar P., Peña C., Gerber M., Chang Y., Caesar S., Schubert O.T., Schlenstedt G., et al. // *Elife.* 2014. V. 3. e03473.
98. Wyler E., Wandrey F., Badertscher L., Montellese C., Alper D., Kutay U. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. № 20. P. 3685–3691.
99. Calviño F.R., Kharde S., Ori A., Hendricks A., Wild K., Kressler D., Bange G., Hurt E., Beck M., Sinning I. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6510.
100. van Hoof A., Lennertz P., Parker R. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 6. P. 1357–1365.
101. Ciganda M., Williams N. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2011. V. 2. № 4. P. 523–533.
102. Sloan K.E., Bohnsack M.T., Watkins N.J. // *Cell Rep.* 2013. V. 5. № 1. P. 237–247.
103. Zhang J., Harnpicharnchai P., Jakovljevic J., Tang L., Guo Y., Oeffinger M., Rout M.P., Hiley S.L., Hughes T., Woolford J.L. // *Genes Dev.* 2007. V. 21. № 20. P. 2580–2592.
104. Chen S.S., Williamson J.R. // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. № 4. P. 767–779.
105. O'Donohue M.F., Choessel V., Faubladiet M., Fichant G., Gleizes P.E. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 190. № 5. P. 853–866.
106. Nicolas E., Parisot P., Pinto-Monteiro C., De Walque R., De Vleeschouwer C., Lafontaine D.L.J. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. e11390.

# *Citrobacter freundii* метионин— $\gamma$ -лиаза: роль серина 339 в катализе реакций $\gamma$ - и $\beta$ -элиминирования

Н. В. Ануфриева<sup>1</sup>, Е. А. Морозова<sup>1</sup>, С. В. Ревтович<sup>1</sup>, Н. П. Бажулина<sup>1</sup>, В. П. Тимофеев<sup>1</sup>,  
Я. В. Ткачев<sup>1</sup>, Н. Г. Фалеев<sup>2</sup>, А. Д. Никулин<sup>3</sup>, Т. В. Демидкина<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Институт белка РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

\*E-mail: tvdemidkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.10.2020

Принята к печати 21.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11242

**РЕФЕРАТ** Остаток активного центра *Citrobacter freundii* метионин— $\gamma$ -лиазы (МГЛ) серин 339 является консервативным у большинства пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов структурного подкласса цистатионин— $\beta$ -лиазы, к которому принадлежит МГЛ. Механизм реакции  $\gamma$ -элиминирования, катализируемой МГЛ, изучен недостаточно. Методом сайт-направленного мутагенеза серин 339 был заменен на аланин. Замена серина 339 на аланин привела к существенному (на два порядка) снижению эффективности катализа мутантной формой фермента реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования. Скорости обмена С- $\alpha$ - и С- $\beta$ -протонов аминокислот в комплексах фермента с конкурентными ингибиторами снизились на один-два порядка. Спектральные характеристики мутантной формы фермента свидетельствуют, что замена не приводит к существенным изменениям конформации и таутомерии внутреннего альдимида МГЛ. Получены кристаллы холофермента и его пространственная структура определена с разрешением 1.7 Å. Замена серина 339 на аланин не повлияла на общий ход полипептидной цепи субъединицы МГЛ и тетрамерную организацию молекулы фермента. Анализ кинетических, спектральных данных и известных пространственных структур *C. freundii* МГЛ свидетельствует, что остаток серина 339 необходим для эффективного катализа реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования на стадии отрыва С- $\alpha$ -протона внешнего альдимида и в реакции  $\gamma$ -элиминирования на стадиях протонирования С4'-атома кофермента и отрыва С- $\beta$ -протона в кетиминном интермедиате.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** метионин— $\gamma$ -лиаза, пиридоксаль-5'-фосфат, Ser339, мутантная форма, кинетические параметры, спектральные характеристики, пространственная структура.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** МГЛ – метионин— $\gamma$ -лиаза; ПЛФ – пиридоксаль-5'-фосфат; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; НОНхонН – D-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназа.

## ВВЕДЕНИЕ

Пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ)-зависимые ферменты определяют жизнедеятельность большинства про- и эукариот. Особенностью этих биокатализаторов является возможность осуществления широкого спектра химических превращений аминокислот и аминов с участием кофактора. Субстратная и реакционная специфичности каждого конкретного фермента обеспечиваются взаимодействием кофактора и субстрата с апоферментом. Исследования ПЛФ-зависимых ферментов и данные рентгеноструктурного анализа позволили существенно продвинуть знания о взаимоотношении структу-

ра-функция в ферментативном катализе и еще в 1995 году использовать рациональный дизайн для изменения субстратной специфичности в ПЛФ-зависимом катализе [1]. Определение кристаллических структур ПЛФ-зависимых ферментов, принадлежащих к различным классам, способствовало расширению знания о критических остатках для химически различных ферментативных реакций и формулировке ряда принципиальных идей в области биокатализа. Замена коферментсвязывающей белковой матрицы на матрицу суперсемейства иммуноглобулинов показала правильность основных выводов о механизмах превращений аминокислот

этим ферментами и возможности предсказания изменения ферментативной активности [2–5].

Метионин- $\gamma$ -лиаза (МГЛ, [КФ 4.4.1.11]) – ПЛФ-зависимый фермент, катализирующий реакции  $\gamma$ -элиминирования *L*-метионина,  $\beta$ -элиминирования *L*-цистеина и их *S*-замещенных производных, а также реакции  $\gamma$ - и  $\beta$ -замещения *L*-метионина, *L*-цистеина и их аналогов [6, 7]. Фермент найден у патогенных простейших [8, 9], в ряде бактерий, в том числе патогенных [10–14], грибах [15] и растениях [16].

Недавно нами было показано, что МГЛ катализирует реакцию  $\beta$ -элиминирования сульфоксидов *S*-замещенных аналогов цистеина с образованием тиосульфатов [17, 18]. Антибактериальная активность тиосульфатов, получаемых «фармакологической парой» МГЛ/сульфоксид *S*-замещенного *L*-цистеина, показана *in vitro* против ряда бактерий [18–20] и *in vivo* против *Pseudomonas aeruginosa* [21]. Перспективность применения фермента в качестве противоопухолевого агента показана *in vitro* и *in vivo* [22–25].

Механизмы физиологической реакции и реакций  $\beta$ -элиминирования и замещения, катализируемых МГЛ, мало исследованы. Исследование этих механизмов вносит вклад не только в фундаментальную энзимологию, оно необходимо для создания новых антибактериальных и противоопухолевых препаратов.

МГЛ принадлежит к структурному подклассу цистатионин- $\beta$ -лиазы с типом укладки I полипептидной цепи ПЛФ-зависимых ферментов [26]. В тетрамерной молекуле МГЛ, образованной четырьмя идентичными полипептидными цепями, две субъединицы формируют два так называемых «каталитических димера», в каждом из которых аминокислотные остатки из двух субъединиц образуют два активных центра [27, 28].

Определение трехмерных структур комплексов МГЛ с конкурентными ингибиторами, глицином [29], циклосерином [30] и норлейцином [31, 32] показало, что остаток активного центра фермента, Ser339, консервативный в подклассе цистатионин- $\beta$ -лиазы, участвует, по всей вероятности, в оптимальной для катализа ориентации боковой группы Lys210, связывающей кофермент.

Для изучения роли остатка Ser339 в катализе реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования методом сайт-направленного мутагенеза получена мутантная форма фермента с заменой Ser339Ala, определены пространственная структура холофермента, стационарные кинетические параметры реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования ряда субстратов, скорости обмена *S*- $\alpha$ - и *S*- $\beta$ -протонов аминокислот в ком-

плексах Ser339Ala МГЛ с ингибиторами и спектральные характеристики мутантной формы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы и материалы

В работе использованы: *L*-метионин, *L*-норвалин, *L*-норлейцин, *L*- $\alpha$ -аминомасляная кислота, глицин, *L*-аланин, *L*-гомосерин, *L*-гомоцистеин, *L*-фенилаланин, *DL*-пеницилламин, фенилметилсульфонилфторид, лактатдегидрогеназа из мышцы кролика (ЛДГ), дитиотреитол (ДТТ), NADH и D<sub>2</sub>O (Sigma, США); пиридоксаль-5'-фосфат (Merck, Германия); *S*-этил-*L*-цистеин, *S*-метил-*L*-цистеин, *S*-бензил-*L*-цистеин, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), протаминсульфат, додецилсульфат натрия (SDS) (Serva, США); лактоза (Panreas, Испания); глюкоза, глицерин, сульфат магния, сульфат аммония, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двухзамещенный, уксусная кислота, уксусный ангидрид, триэтанолламин, HClO<sub>4</sub> («Реахим», Россия); дрожжевой экстракт, триптон (Difco, США); DEAE-целлюлоза (Whatmann, Англия); супердекс 200 (Amersham Biosciences, Швеция); плазмиды Bluescript II SK(+/-) и pET28 (Novagen, США); набор для выделения ДНК, эндонуклеазы рестрикции Bsp119I и BveI (Fermentas, Литва). *O*-Ацетил-*L*-гомосерин получен ацетилированием *L*-гомосерина [33]; *D*-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназа (НОНхонДН) получена согласно [34].

### Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали плазмиду mgIBlue, полученную клонированием гена МГЛ в вектор Bluescript II SK(+/-). Для замены Ser339 на Ala использовали следующие синтетические олигонуклеотиды (F – прямой праймер, R – обратный праймер):  
(F) TATCAGCTTCGAATCGCTGGC,  
(RS339/A) GTATCACCGAGAGCGACCGCGA,  
(FS339/A) TCGCGGTTCGCTCTCGGTGATAC,  
(R) ATACCTGCTTTAAGCCGCTCTTCTGGCGCA.

После проведения ПЦР из реакционной смеси выделяли ампликон (использовали набор для выделения ДНК). Очищенный препарат ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Bsp119I и BveI и лигировали с вектором mgIBlue, обработанным этими же ферментами. Полученную смесь трансформировали электропорацией в клетки *Escherichia coli* DH10B и выращивали на твердой среде (1.8% агар на среде Лурия–Бертани (LB) с ампициллином). Выраженные колонии переносили в жидкую



среду LB с добавлением ампициллина и растили в течение 15–18 ч. Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора для выделения плазмид и идентифицировали путем аналитической рестрикции. Фрагмент, содержащий замену Ser339Ala, был переклонирован из плазмиды mg1Blue в pET28. Точность клонирования контролировали путем секвенирования вставки ДНК (ЦКП «Геном», Москва). Клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой, содержащей необходимую вставку.

### Выращивание бактериальной массы и очистка фермента

Клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиду с геном мутантной формы, выращивали и очищали фермент как описано ранее [35]. Концентрацию очищенных препаратов фермента определяли по поглощению при 278 нм, используя коэффициент поглощения  $A_{1\text{см}}^{0.1\%} = 0.8$  [36].

Гомогенность препаратов проверяли ПААГ-электрофорезом в денатурирующих условиях [37]. Активность в процессе очистки определяли в реакции β-элиминирования, активность конечного препарата определяли в реакциях β- и γ-элиминирования. Реакционная смесь содержала 100 мМ калий-фосфатный буфер, pH 8.0, 0.1 мМ ПЛФ, 1 мМ ДТТ, 0.2 мМ NADH, 10 ед. ЛДГ и 30 мМ S-этил-L-цистеин (реакция β-элиминирования) или 70 мкг НОНхоДН и 30 мМ L-метионин (реакция γ-элиминирования). За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1.0 мкМ/мин кетокислоты. Удельная активность препаратов фермента 95%-ной чистоты была равна 0.31 ед/мг в реакции γ-элиминирования L-метионина и 1.03 ед/мг в реакции β-элиминирования S-этил-L-цистеина.

### Кинетические исследования

Кинетические параметры реакций γ- и β-элиминирования определяли при 30°C в сопряженной реакции с НОНхоДН или ЛДГ по уменьшению поглощения NADH при 340 нм ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Реакционные смеси содержали 100 мМ калий-фосфатный буфер, pH 8.0, 0.1 мМ ПЛФ, 1 мМ ДТТ, 0.2 мМ NADH, 70 мкг НОНхоДН или 10 ед. ЛДГ и варьируемые количества субстратов в общем объеме 1 мл. Реакцию инициировали добавлением 10 мкг фермента.

Ингибирование реакции γ-элиминирования L-метионина различными аминокислотами исследовали в условиях, описанных выше, варьируя количества ингибитора в пробах.

Кинетические параметры обрабатывали согласно уравнению Михаэлиса–Ментен, используя програм-

му EnzFitter [38]. В расчетах использовали величину молекулярной массы субъединицы фермента, равную 43 кДа. Значения констант ингибирования также определяли с помощью программы EnzFitter [38].

### Изотопный обмен C-α- и C-β-протонов ингибиторов в комплексах с ферментом

Кинетику реакций изотопного обмена C-α- и C-β-протонов ингибиторов на дейтерон, катализируемых мутантной формой, регистрировали с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Реакцию проводили в D<sub>2</sub>O, содержащей 50 мМ калий-фосфат (pD = 7.6), 0.1 мМ ПЛФ и ингибитор в общем объеме 0.5 мл при 30°C и концентрации L-аланина и L-норлейцина 144.23 и 98.04 мМ. Реакцию инициировали, добавляя 0.3–0.7 мг фермента. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР записывали через определенные интервалы времени на спектрометре Bruker AMXIII-400 с рабочей частотой 400 МГц. Сигналы C-α- и C-β-протонов интегрировали с помощью модифицированной программы автоматизации enzkin, входящей в состав XWIN\_NMR-программ. Кинетические кривые накопления дейтерированных продуктов обрабатывали по методу, описанному в [39].

Изотопный обмен протонов глицина проводили в D<sub>2</sub>O, pD = 7.6, содержащей 50 мМ калий-фосфат, 0.1 мМ ПЛФ, 60 мг глицина и 3.6 мг фермента. После инкубирования в течение 72 ч при 30°C фермент инактивировали нагреванием (90°C, 5 мин) и отделяли центрифугированием. Растворитель удаляли на ротационном испарителе. Для определения конфигурации у C-α-атома дейтерированный продукт был превращен в дипептид, L-фенилаланил-[D]-глицин в реакции с Вос-L-Phe-ONp [40, 41]. Дипептид растворяли в 0.5 мл D<sub>2</sub>O, и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр записывали на спектрометре Bruker AMXIII-400 с рабочей частотой 400 МГц.

### Спектральные исследования

Спектры поглощения холофермента и его комплекса с метионином регистрировали при 25°C на спектрофотометре Cary-50 (Varian, США) в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 1 мМ ДТТ, 1 мМ EDTA, 20 мМ L-метионина при концентрации фермента 1 мг/мл.

### Получение холофермента и апофермента

Апофермент и холофермент получали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 1 мМ ДТТ, 1 мМ EDTA. Холофермент получали добавлением 50-кратного молярного избытка ПЛФ. Смесь инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Избыток ПЛФ удаляли диализом. Для получения апофермента к препарату добавляли 100-кратный моляр-

ный избыток *DL*-пеницилламина [42]. Смесь инкубировали в течение 1 ч при 25°C. *DL*-пеницилламин удаляли диализом. Процедуру повторяли до тех пор, пока активность фермента не снизилась до 1% от начальной. Содержание ПЛФ в препарате определяли в 100 мМ NaOH, используя значение молярного коэффициента поглощения ПЛФ при 390 нм, равное 6600 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [43].

### Определение константы диссоциации кофермента

Для определения константы диссоциации ПЛФ использовали метод ультрафильтрации [44]. Варьируемые количества ПЛФ (в диапазоне 5 × 10<sup>-3</sup>–1.2 × 10<sup>-1</sup> мМ) добавляли к 8 × 10<sup>-3</sup> мМ раствору апофермента в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 1 мМ ДТТ и 1 мМ EDTA. После 30 мин инкубации при 30°C свободный ПЛФ отделяли ультрафильтрацией на Centricon-30 microconcentrator (Amicon, США) центрифугированием в течение 5 мин при 5000 об/мин и 4°C. Содержание ПЛФ в каждой пробе определяли в 100 мМ NaOH. Данные обрабатывали в координатах Скэтчарда [45].

### Кристаллизация и сбор данных

Кристаллы МГЛ Ser339Ala получали методом диффузии паров в висящей капле в условиях, приведенных в [28]. Кристаллы, пригодные для сбора дифракционных данных, образовывались в течение 10 дней и имели ромбическую форму. Дифракционные данные были собраны на источнике синхротронного излучения, линия BESSY BEAMLINE 14.1 (Берлин, Германия), с использованием детектора MARMOSAIC 225 mm CCD при 100 К и обработаны в программном комплексе XDS [46] (табл. 1).

### Определение и уточнение пространственной структуры Ser339Ala МГЛ

Структура МГЛ Ser339Ala решена методом молекулярного замещения с помощью программного комплекса CCP4 [47] и использованием в качестве модели определенной нами ранее структуры *S. freundii* МГЛ (1.35 Å, код PDB 2RFV), из которой были исключены подвижные участки фермента, молекулы воды и кофермент. Для полученной модели была рассчитана карта электронной плотности. Дальнейший расчет структуры проводили с использованием протоколов уточнения Phenix [48] с минимизацией энергии и оптимизацией геометрии модели с последующей ручной правкой в программе COOT [49]. Процесс уточнения контролировали с использованием фактора достоверности модели

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционных данных и уточненной структуры Ser339Ala МГЛ

Пространственная группа	<i>I</i> 222
Параметры элементарной ячейки, Å	$a = 56.66, b = 123.09,$ $c = 128.79$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Длина волны, Å	0.91841
Разрешение, Å	30.0–1.70 (1.79–1.70)
Полнота набора, %	99.4 (97.5)
Избыточность	7.0 (6.3)
$R_{\text{merge}}, \%$	4.5 (34.9)
Неупорядоченные аминокислотные остатки в структуре белка	1, 46–61, 398
Число неводородных атомов белка	2879
Число молекул воды	393
Число уникальных отражений	49574 (7001)
$R/R_{\text{free}}$	0.173/0.205 (0.243/0.285)
Средний температурный фактор $B, \text{Å}^2$	29.28
макромолекулы	27.51
растворителя	41.64
Среднеквадратическое отклонение от идеальных значений	
длин связей	0.007 Å
валентных углов	1.095°
хиральных углов	0.047°
планарных углов	0.005°
Область расположения аминокислотных остатков на карте Рамачандрана	
наиболее предпочтительная, %	98.64
дополнительно разрешенная, %	1.36
допустимая, %	0.0

Примечание. В скобках приведены значения для слоя высокого разрешения.

$R_{\text{free}}$ , рассчитанный по 5% отражений, исключенных из уточнения. Окончательная модель уточнена до разрешения 1.70 Å с показателями  $R_{\text{work}}$  и  $R_{\text{free}}$  17.3 и 20.5%. Модель содержит 2879 неводородных атомов белка и 393 молекулы воды; боковая группа остатка Lys210 ковалентно связана с ПЛФ. Для трех цистеинов (Cys4, Cys193 и Cys245) возле атома серы наблюдалась избыточная электронная плотность, что позволило сделать вывод об их окисленных состояниях и заменить на 3-сульфеноаланины. Структура депонирована в банк данных белковых структур (код PDB 5D5S), статистика уточнения структуры приведена в табл. 1.

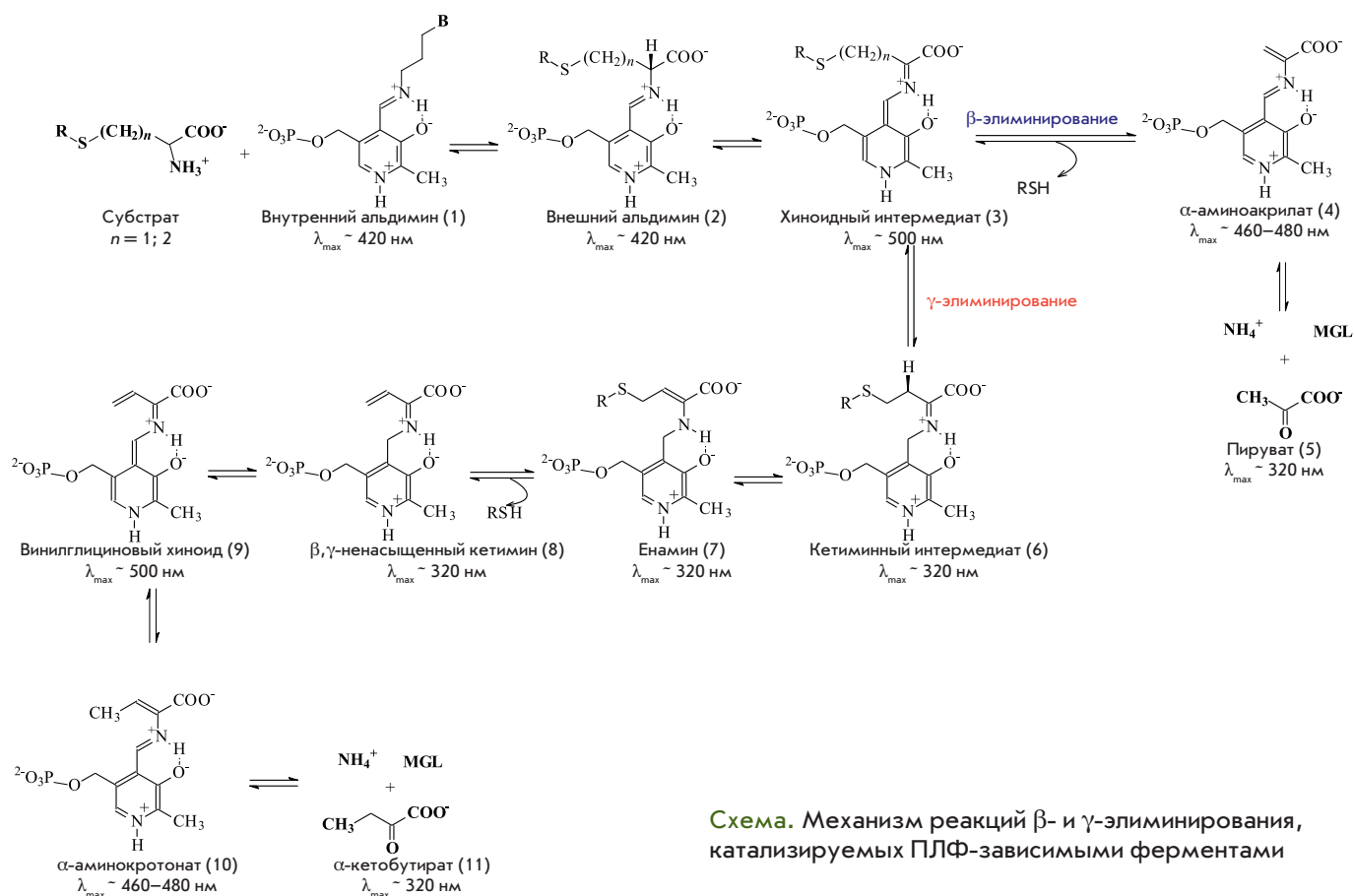


Схема. Механизм реакций  $\beta$ - и  $\gamma$ -элиминирования, катализируемых ПЛФ-зависимыми ферментами

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования, приведенный на *схеме*, предложен в работах [50, 51]. Благодаря наличию кофермента, ПЛФ-зависимые ферменты обладают уникальными спектральными свойствами, позволяющими идентифицировать интермедиаты ферментативной реакции. Основные полосы поглощения внутреннего альдимина и интермедиатов реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования приведены на *схеме* согласно [52].

В ПЛФ-зависимых ферментах, катализирующих разнообразные реакции, начинающиеся с отрыва С- $\alpha$ -протона во внешнем альдимине, основанием, акцептирующим этот протон, является остаток лизина, связывающий кофермент. Предполагается, что в реакции  $\beta$ -элиминирования серосодержащих аминокислот, катализируемых ферментами подкласса цистатионин- $\beta$ -лиазы, коферментсвязывающий остаток лизина является также общим кислотным катализатором на стадии элиминирования уходящей группы [51, 53].

В работе [54] авторы предположили, что коферментсвязывающий остаток лизина цистатионин- $\gamma$ -лиазы переносит протон от С- $\alpha$ -атома к С4'-атому

ПЛФ. Исходя из структурных данных сделан вывод, что боковая цепь этого остатка может «качаться как лиана» между С- $\alpha$ -, С4'- и С- $\beta$ -атомами субстрата, а его  $\epsilon$ -аминогруппа также является основанием, акцептирующим С- $\beta$ -протон.

Анализ пространственной структуры комплекса *C. freundii* МГЛ с глицином, моделирующего структуру внешнего альдимина, позволил предположить, что ПЛФ-связывающий остаток Lys210 обеспечивает как 1,3-прототропный сдвиг С- $\alpha$ -протона, так и отрыв С- $\beta$ -протона [29]. Исследование мутантной формы *Pseudomonas putida* МГЛ с заменой Tyr114 активного центра на Phe показало, что роль общего кислотного катализатора на стадии элиминирования уходящей группы, по всей вероятности, выполняет Tyr114 [55].

Анализ пространственных структур четырех интермедиатов, образующихся при взаимодействии МГЛ из *Entamoeba histolytica* с L-метионином, позволил предложить механизм реакции  $\gamma$ -элиминирования, отличный от приведенной выше схемы, исключая стадии двух хиноидных интермедиатов (*схема*, интермедиаты 3 и 9) [56]. Этот механизм постулирует образование  $\alpha$ -аминокротоната

Таблица 2. Кинетические параметры реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования

Субстрат	МГЛ, дикий тип			МГЛ, Ser339Ala		
	$k_{\text{кат}}, \text{c}^{-1}$	$K_M, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}/K_M, \text{М}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_{\text{кат}}, \text{c}^{-1}$	$K_M, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}/K_M, \text{М}^{-1}\text{c}^{-1}$
<i>L</i> -Met	$6.2 \pm 0.42^*$	$0.7 \pm 0.11^*$	$8.85 \times 10^3$	$0.21 \pm 0.002$	$1.84 \pm 0.15$	$1.77 \times 10^2$
<i>DL</i> -Hcy	$8.51 \pm 0.41^*$	$0.97 \pm 0.15^*$	$8.77 \times 10^3$	$0.28 \pm 0.009$	$3.39 \pm 0.34$	$8.25 \times 10^1$
<i>S</i> -Et- <i>L</i> -Hcy	$6.78 \pm 0.02^*$	$0.54 \pm 0.01^*$	$1.25 \times 10^4$	$0.16 \pm 0.0016$	$0.54 \pm 0.037$	$2.92 \times 10^2$
<i>O</i> -Ac- <i>L</i> -Hse	$2.1 \pm 0.053^{**}$	$2.91 \pm 0.18^{**}$	$7.21 \times 10^2$	$0.77 \pm 0.011$	$2.07 \pm 0.22$	$3.73 \times 10^2$
<i>S</i> -Me- <i>L</i> -Cys	$4.6 \pm 0.29^*$	$0.71 \pm 0.11^*$	$6.48 \times 10^3$	$0.41 \pm 0.018$	$21.8 \pm 2.25$	$1.88 \times 10^1$
<i>S</i> -Et- <i>L</i> -Cys	$5.03 \pm 0.16^*$	$0.17 \pm 0.02^*$	$2.96 \times 10^4$	$0.67 \pm 0.024$	$6.47 \pm 0.54$	$1.04 \times 10^2$
<i>S</i> -Bzl- <i>L</i> -Cys	$8.16 \pm 0.23^*$	$0.18 \pm 0.02^*$	$4.53 \times 10^4$	$1.81 \pm 0.094$	$5.76 \pm 0.59$	$3.14 \times 10^2$
<i>O</i> -Ac- <i>L</i> -Ser	$2.13 \pm 0.037^{***}$	$4.28 \pm 0.33^{***}$	$4.98 \times 10^2$	$0.047 \pm 0.001$	$16.36 \pm 1.09$	2.87

\*Данные [35].

\*\*Данные [36].

\*\*\*Данные [57].

вслед за  $\beta, \gamma$ -ненасыщенным кетимином в результате 1,5-сигматропного сдвига протона от  $C4'$ -атома к  $C\gamma$ -атому, не требующего катализа.

**Параметры стационарной кинетики, ингибирование реакции  $\gamma$ -элиминирования и обмен  $C\alpha$ - и  $C\beta$ -протонов в комплексах Ser339Ala МГЛ с ингибиторами**

В табл. 2 приведены параметры стационарной кинетики реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования, катализируемых МГЛ дикого типа [35, 36, 57] и мутантной формой. Замена остатка Ser339 на Ala привела к снижению скоростей реакций  $\beta$ -элиминирования в 5–10 раз и  $\gamma$ -элиминирования в 30–40 раз по сравнению с ферментом дикого типа. Величины  $K_M$  в большей степени увеличились для субстратов, содержащих уходящую группу в  $\beta$ -положении. Как результат, каталитическая эффективность обеих реакций снизилась одинаково, в среднем на два порядка. В случае субстратов с хорошо уходящей группой, каталитическая эффективность мутантной формы в реакции  $\gamma$ -элиминирования сравнима с эффективностью МГЛ дикого типа, но в реакции  $\beta$ -элиминирования *O*-Ac-*L*-Ser параметр  $k_{\text{кат}}/K_M$  меньше на два порядка.

Как и для дикого типа, для мутантной формы фермента глицин, *L*-аланин, *L*- $\alpha$ -аминомасляная кислота, *L*-норвалин, *L*-норлейцин являются конкурентными ингибиторами физиологической реакции. Величины констант ингибирования оказались

сравнимыми с константами для МГЛ дикого типа (табл. 3).

Данные изотопного обмена протонов субстратов и ингибиторов позволяют оценить вклад отдельных стадий в ферментативную реакцию и выяснить стереохимию обмена протонов. В табл. 3 приведены результаты исследования скоростей обмена  $C\alpha$ - и  $C\beta$ -протонов ингибиторов, катализируемого МГЛ Ser339Ala в сравнении с МГЛ дикого типа. Замена привела к замедлению скоростей обмена  $C\alpha$ - и  $C\beta$ -протонов ингибиторов. Скорость обмена  $C\alpha$ -протона в комплексах мутантной формы фермента с глицином и норлейцином по сравнению с комплексами фермента дикого типа уменьшилась на два порядка, скорости обмена  $C\beta$ -протонов снизились на порядок.

Изучение стереоспецифичности обмена протонов глицина ферментом дикого типа показало, что соотношение скоростей обмена *pro*-(*R*)- и *pro*-(*S*)-протонов составляет 14000 : 1 [40]. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР дипептида *L*-фенилаланилглицин (данные не приведены), содержавшего глицин, выделенный после инкубации мутантной формы фермента с глицином в  $\text{D}_2\text{O}$ , содержал сигнал при 3.4 м.д., характерный для метиленового *pro*-(*R*)-протона глицина [41].

Нам не удалось обнаружить обмен *pro*-(*S*)-протона после инкубации мутантной формы с глицином в течение длительного времени, поскольку это приводило к инактивации МГЛ Ser339Ala. Полученные данные показали, что, как и фермент



Таблица 3. Ингибирование реакции  $\gamma$ -элиминирования *L*-метионина и кинетические параметры изотопного обмена на С- $\alpha$ - и С- $\beta$ -протонов ингибиторов

Амино-кислота	МГЛ, дикий тип			МГЛ, Ser339Ala			Количество обмениваемых С- $\alpha$ - и С- $\beta$ -протонов
	$K_{И}$ , мМ	$k_{ог}, c^{-1}$ $K_M = K_{II}$ , мМ		$K_{И}$ , мМ	$k_{ог}, c^{-1}$ $K_M = K_{II}$ , мМ		
		$\alpha$ -Н	$\beta$ -Н		$\alpha$ -Н	$\beta$ -Н	
Gly	48.49 $\pm$ 4.37*	20.2*	-	22.87 $\pm$ 2.84	0.078	-	1, <i>pro</i> -(R)-протон**
<i>L</i> -Ala	3.41 $\pm$ 0.40*	2.71*	2.63*	1.25 $\pm$ 0.32	0.387	0.116	1; 3
<i>L</i> - $\alpha$ -Abu	8.01 $\pm$ 0.76*	-	-	4.66 $\pm$ 0.51	-	-	
<i>L</i> -Nva	4.60 $\pm$ 0.43*	-	-	1.7 $\pm$ 0.32	-	-	
<i>L</i> -Nle	0.6 $\pm$ 0.06*	41.78*	4.74*	0.89 $\pm$ 0.09	0.46	0.12	1; 2

Примечание.  $K_{И}$  – константа ингибирования,  $K_M$  – константа Михаэлиса,  $K_{II}$  – константа ингибирования продуктом, характеризующая связывание фермента с продуктом изотопного обмена.

\*Данные [36].

\*\*Данные [40].

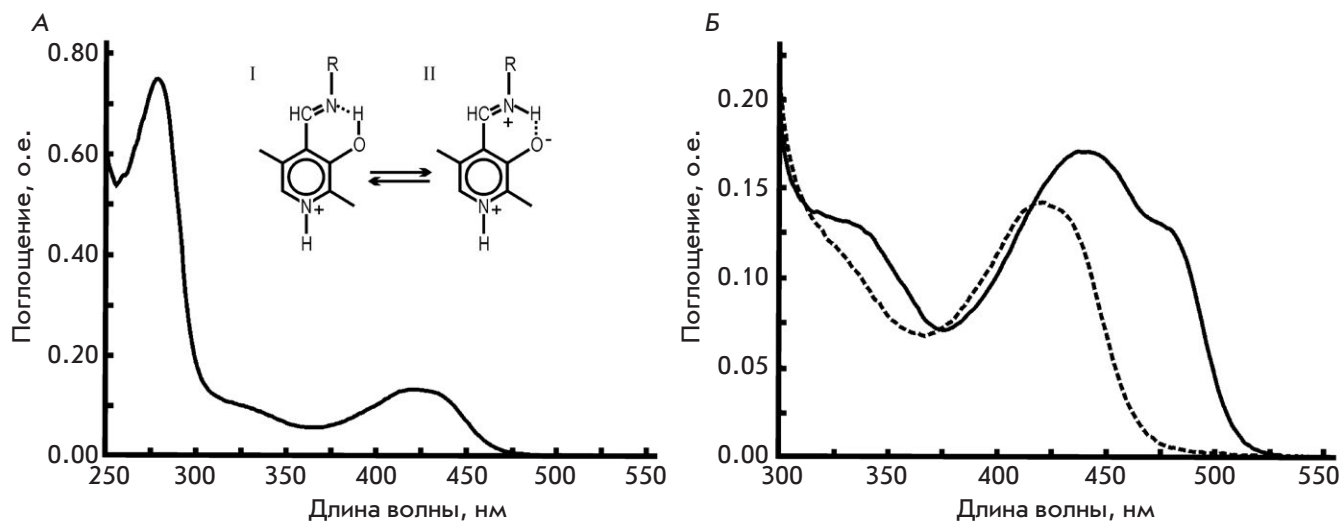


Рис. 1. Спектры поглощения: холофермента МГЛ Ser339Ala (А); комплексов МГЛ с *L*-метионином: МГЛ дикого типа (сплошная линия) и МГЛ Ser339Ala (пунктирная линия) (Б). Спектры снимали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 8.0, содержащем 1 мМ ДТТ, 1 мМ EDTA при концентрации фермента 1 мг/мл

дикого типа, мутантная форма МГЛ преимущественно обменивает *pro*-(R)-протон.

### Спектральные исследования

На рис. 1 приведены спектры поглощения холофермента Ser339Ala и его комплекса с *L*-метионином. Спектр поглощения мутантной формы фермента имеет типичный для альдиминового ПЛФ вид с основной полосой в области 420 нм и полосой в области 320 нм.

Данные логнормального разложения спектра холофермента, которое проводили, как опи-

сано для фермента дикого типа [37], приведены в табл. 4. Внутренний альдимин мутантной формы описывается четырьмя структурами: кетоенамин, его таутомер, енолимин (рис. 1А; структуры II, I) и два конформера кетоенамина – конформер, у которого альдиминная группа находится в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла (табл. 4, структура II<sup>+</sup>), и конформер с альдиминной связью, выведенной из плоскости кольца кофермента, но с сохранением сопряжения с  $\pi$ -электронами кольца кофермента и водородной связи между альдиминным атомом азота и 3'-оксигруппой кофер-

Таблица 4. Параметры полос спектра поглощения внутреннего альдимида Ser339Ala МГЛ

Структура	$E$ , эВ	$\nu \times 10^{-3}$ , см <sup>-1</sup>	$\lambda$ , нм	$\varepsilon \times 10^{-3}$ , М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	$W \times 10^{-3}$ , см <sup>-1</sup>	$\rho$	$f$	$n$ , %
II <sup>1</sup>	2.92	23.58	424.1	10.46	3.58	1.55	0.18	52.9
II <sup>2</sup>	3.24	26.10	383.1	8.27	3.87	1.37	0.03	10.4
I	3.63	29.26	341.8	9.75	3.65	1.23	0.06	20.0
II <sup>+</sup>	3.80	30.67	326.1	8.50	3.47	1.29	0.05	16.7
II <sup>2*</sup>	4.28	34.52	289.7	12.20	5.06	1.20	0.29	
*	4.55	36.56	272.8	23.10	4.56	1.39	0.79	

Примечание.  $E$  – энергия электронного перехода;  $\nu$  – волновое число;  $\lambda$  – длина волны;  $\varepsilon$  – коэффициент молярного поглощения;  $W$  – полуширина;  $\rho$  – асимметрия;  $f$  – сила осциллятора;  $n$  – содержание таутомеров и конформеров.

Надстрочные индексы (1, 2) относятся к первому и второму электронным переходам структуры II. Надстрочные индексы (+, 2) относятся к двум конформерам структуры II (конформер с альдиминной связью, находящейся в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла, и конформер с альдиминной связью, частично выведенной из плоскости пиридинового кольца, но сохраняющей сопряжение с  $\pi$ -электронами кольца кофактора и водородную связь между альдиминным азотом и 3'-оксигруппой кофермента).

\*Экспериментальная информация об этих полосах недостаточна.

мента (табл. 4, структура II<sup>2</sup>). Параметры полос поглощения, полученные при разложении спектра, приведены в табл. 4.

Найденные структуры и параметры их полос поглощения оказались практически такими же, как у фермента дикого типа [36]. Величина константы диссоциации комплекса ПЛФ для МГЛ дикого типа составляет  $6.24 \times 10^{-4}$  мМ [57]. Константа диссоциации ПЛФ мутантной формы фермента составила  $1.01 \times 10^{-3}$  мМ. Таким образом, замена несущественно повлияла на родство апофермента к коферменту и на конформацию и таутомерию внутреннего альдимида. Она привела к некоторому изменению количественного состава таутомеров и конформеров внутреннего альдимида. Реакционноспособной формой внутреннего альдимида является кетоенамин. В холоферменте дикого типа его содержание составляет 67.6% [36], в холоферменте мутантной формы – 52.9% (табл. 4).

В спектрах поглощения и кругового дихроизма комплекса МГЛ дикого типа с  $L$ -метионином имеются полосы с максимумами при 440 и 480 нм [36]. Эти полосы в спектрах ПЛФ-зависимых ферментов относят к интермедиатам реакций  $\beta$ - и  $\gamma$ -элиминирования –  $\alpha$ -аминокротонату или  $\alpha$ -аминоакрилату [54]. Наличие  $\alpha$ -аминокротоната в спектре комплекса МГЛ дикого типа с  $L$ -метионином и кинетические данные взаимодействия фермента дикого типа с рядом субстратов и ингибиторов позволили предположить, что скоростьлимитирующая стадия физиологической реакции следует после стадии образования  $\alpha$ -аминокротоната [36]. В спектре поглощения комплекса мутантной формы фермента

с  $L$ -метионином отсутствует поглощение в области 440–480 нм. Следовательно, замена Ser339 на Ala привела к торможению реакции  $\gamma$ -элиминирования на стадии/ях, следующих за стадией внешнего альдимида.

#### Пространственная структура холофермента мутантной формы

Пространственная структура Ser339Ala МГЛ определена с разрешением 1.7 Å. Замена серина 339 на аланин не повлияла на пространственную структуру фермента. Общий ход полипептидной цепи Ser339Ala МГЛ остается практически таким же, как у холофермента МГЛ дикого типа (рис. 2А). Среднеквадратическое отклонение положений  $\alpha$ -атомов Ser339Ala МГЛ по сравнению с их положениями в структуре фермента дикого типа (код PDB 2RFV) составляет 0.29 Å<sup>2</sup>. Как и в определенных нами ранее структурах *C. freundii* МГЛ [29–31], а также в структурах МГЛ из других микроорганизмов, для структуры Ser339Ala МГЛ характерна подвижность фрагментов N- и C-концевых участков полипептидной цепи (рис. 2А) [28]. Из-за высокой подвижности N-концевого фрагмента в структуре Ser339Ala МГЛ не локализован длинный участок, состоящий из 16 аминокислот (46–61), включающий остатки тирозина 58 и аргинина 60, боковые группы которых образуют водородные связи с O2P-атомом фосфатной «ручки» кофермента (рис. 2Б).

Средний температурный B-фактор аминокислотных остатков, принадлежащих подвижному C-концевому фрагменту (54.02 Å<sup>2</sup>, остатки 353–368), в 2 раза выше среднего температурного фактора

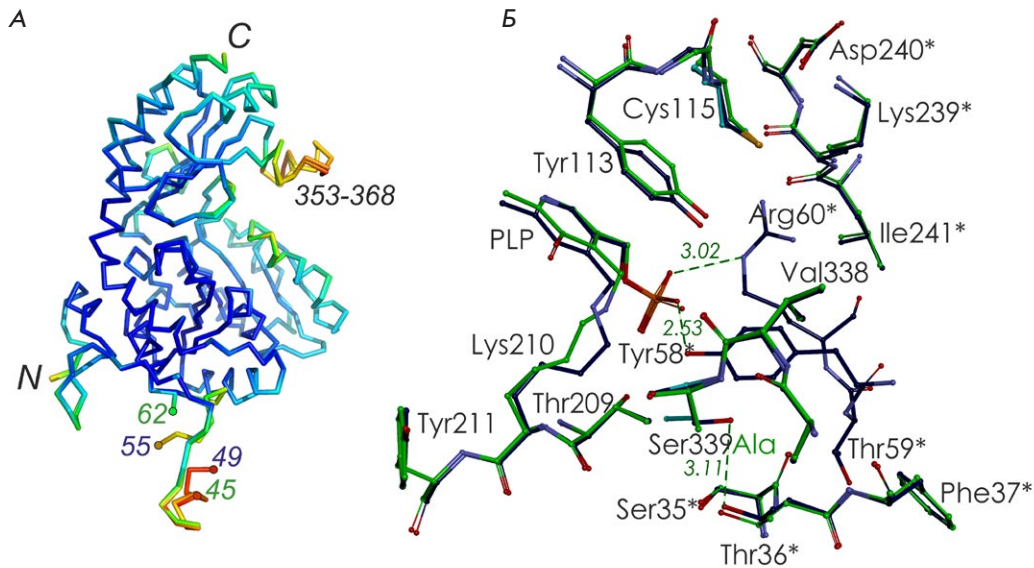


Рис. 2. Наложение структур *C. freundii* МГЛ дикого типа (код PDB 2RFV; зеленый) и Ser339Ala МГЛ (код PDB 5D5S; темно-синий): А – общий ход полипептидной цепи с окраской по В-фактору от темно-синего до красного при увеличении значения; Б – фрагменты активных центров; звездочками отмечены остатки, принадлежащие соседней субъединице каталитического димера. PLP – кофермент

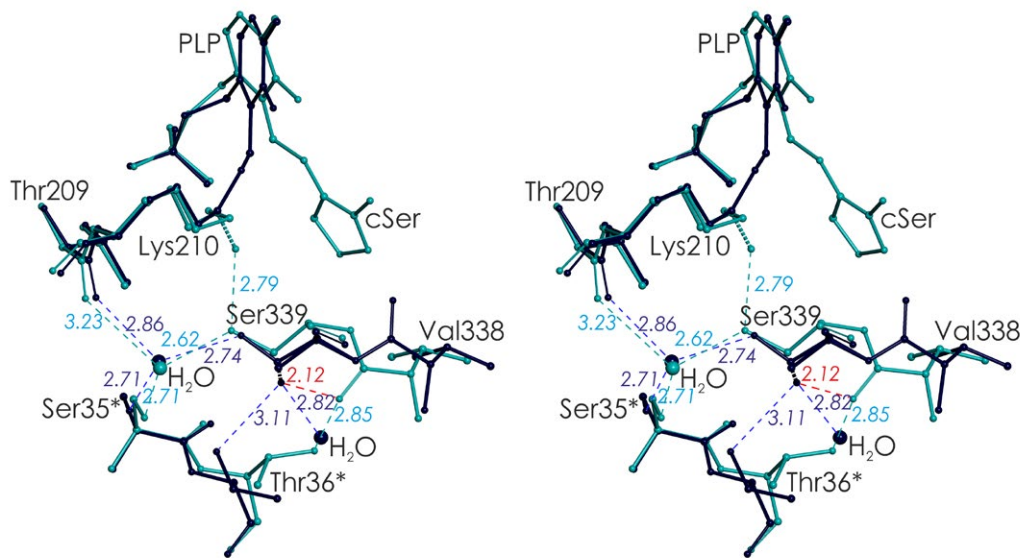


Рис. 3. СтереоиЗОбражение наложения фрагментов активного центра МГЛ *C. freundii*: холофермент дикого типа (код PDB 2RFV, темно-синий) и комплекс с *L*-циclosерином (код PDB 4OMA, голубой). Звездочками отмечены остатки, принадлежащие соседней субъединице каталитического димера. Альтернативные положения аминокислотных остатков показаны штриховыми линиями

стабильных участков фермента. Такая мобильность может быть связана с обеспечением вывода из активного центра фермента продуктов реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования [30]. Замена серина 339 на аланин привела к потере водородной связи между ним и остатком треонина 36 соседней субъединицы каталитического димера (рис. 2Б), однако это не вызвало изменений в тетрамерной организации молекулы Ser339Ala МГЛ.

**Пространственные структуры ковалентных и нековалентных комплексов МГЛ с ингибиторами, роль Ser339 в катализе реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования**

В пространственной структуре холофермента *C. freundii* МГЛ дикого типа (код PDB 2RFV) боковая

цепь Ser339 находится в двух равновероятных положениях (рис. 3). В одном из них она располагается в области активного центра фермента рядом с Lys210, во втором – в области межсубъединичного взаимодействия с N-концевым доменом соседней субъединицы каталитического димера. Оба положения боковой цепи Ser339 стабилизированы водородными связями и хорошо различимы на карте электронной плотности.

В пространственных структурах комплексов МГЛ с ингибиторами, моделирующими комплекс Михаэлиса, внешний альдимин и кетиминный интермедиат, боковая цепь Ser339 занимает единственное положение, при котором его O $\gamma$ -атом направлен в сторону Lys210 [29–32]. При связывании МГЛ с ингибиторами их карбоксильные группы

«выталкивают» карбонильную группу пептидной связи между Ser339 и Val338 из полости активного центра в область межсубъединичных контактов и C=O-группа поворачивается на 180° [29, 32]. При таком повороте расстояние между Oγ-атомом Ser339 и атомом кислорода главной цепи Val338 сокращается до 2.12 Å, это приводит к выталкиванию Oγ-атома Ser339 в область активного центра фермента (рис. 3). Так обеспечивается единственное положение боковой группы Ser339, при котором его Oγ-атом образует с Nζ-атомом Lys210 водородную связь. Ее расстояние составляет 2.85 Å в комплексе Cys115His МГЛ с *L*-норлейцином, моделирующим внешний альдимин [31], и 2.79 Å в комплексе *C. freundii* МГЛ с *L*-цикloserином, моделирующим кетиминный интермедиат [30] (рис. 3).

Выше отмечалось, что N-концевой фрагмент МГЛ подвижен как в структурах холофермента дикого типа, так и в холоферменте Ser339Ala МГЛ. Связывание ингибиторов МГЛ дикого типа приводит к стабилизации этого фрагмента [30, 32]. Вероятно, такая стабилизация имеет место и при связывании субстратов и ингибиторов Ser339Ala МГЛ.

На рис. 4 представлены фрагменты активного центра комплекса *C. freundii* МГЛ с *L*-цикloserином, в которых наблюдаются два положения боковой цепи Lys210.

В одном положении, аналогичном положению боковой цепи Lys210 в структуре комплекса мутантной формы с норлейцином [31], моделирующего внешний альдимин, Nζ-атом Lys210 стабилизирован водородными связями с гидроксильными группами боковых цепей Ser339 и Tyr58\* (2.79 Å и 2.82 Å; рис. 4А). Боковая группа Lys210 практически перпендикулярна плоскости кольца кофермента и находится на расстоянии 3.28 Å от C-α-pro-(R)-протона и 3.15 Å от Cβ-атома *L*-цикloserина (рис. 4Б). Такое положение благоприятно для обеспечения отрыва C-α-pro-(R)-протона или C-β-протона боковой аминокислотной группой Lys210.

В другом положении Nζ-атом Lys210 находится на расстоянии водородной связи от гидроксильных групп боковых цепей Ser207 и Tyr58\* (3.30 Å и 2.96 Å; рис. 4А). В этом положении Nζ-атом Lys210 находится наиболее близко (3.23 Å) к C4'-атому ПЛФ, в то время как расстояние до Cα-атома субстрата увеличивается на 0.43 Å (рис. 4Б). Это положение боковой группы Lys210 благоприятно для переноса C-α-протона к C4'-атому кофермента.

Таким образом, если Tyr58\* участвует в стабилизации обоих положений Nζ-атома Lys210, то боковые группы Ser339 и Ser207, располагающиеся с противоположных сторон от Lys210, обеспечивают оптимальное положение его ε-аминогруппы на ста-

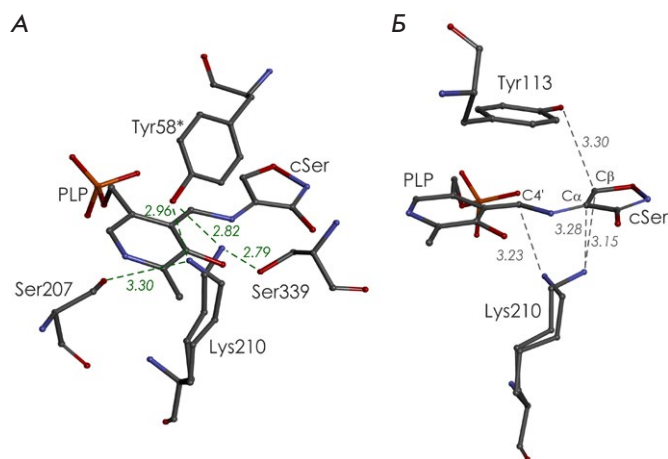


Рис. 4. А – окружение Lys210 в активном центре комплекса *C. freundii* МГЛ с *L*-цикloserином (код PDB 4OMA). Звездочками обозначены аминокислотные остатки, принадлежащие второй субъединице каталитического димера. Б – положение Nζ-атома азота боковой цепи Lys210 относительно C4'-атома ПЛФ, C-α- и C-β-атомов ингибитора

диях отрыва C-α-протона во внешнем альдимине, протонировании C4'-атома ПЛФ и отрыва C-β-протона в кетиминном интермедиате.

В комплексах мутантной формы с субстратами и ингибиторами группа Lys210 может образовывать только одну водородную связь с гидроксильной группой Tyr58\*. Это будет приводить к нарушению оптимальной для отрыва C-α-протона конформации боковой группы Lys210 и понижению ее рKa. Очевидно, этим объясняется уменьшение наблюдаемой скорости обмена C-α-протона ингибиторов. Ранее предположили, что обмен C-β-протонов осуществляется по механизму с обращением конфигурации, когда первый протон отрывается боковой группой Lys210, а второй протон приходит с противоположной стороны от боковой группы Tyr113. В результате оба C-β-протона обмениваются с одинаковой скоростью [29]. В случае мутантной формы Ser339Ala реакция изотопного обмена C-β-протонов замедляется и оба β-протона обмениваются с одинаковой скоростью.

Вероятно, водородная связь между Nζ-атомом Lys210 и Oγ-атомом Ser339 обеспечивает как оптимальное для отрыва C-α- и C-β-протонов положение аминокислотной группы Lys210, так и стабилизацию ее аммонийной формы для 1,3-прототропного сдвига C-α-протона к C4'-атому кофермента и эффективный обмен C-α- и C-β-протонов в комплексах с субстратами и ингибиторами. Присутствие в спектре поглощения комплекса Ser339Ala с *L*-метионином полосы



поглощения внешнего альдимида также позволяет считать, что замена серина 339 на аланин приводит к торможению физиологической реакции на стадии отрыва C- $\alpha$ -протона во внешнем альдимида.

Если образование  $\alpha$ -аминокротоната происходит по механизму, предложенному в работе [50],  $\epsilon$ -аминогруппа Lys210 может принимать участие как основание или кислота на стадиях физиологической реакции, следующих за элиминированием метилмеркаптана, и замена Ser339 может приводить к замедлению этих стадий физиологической реакции.

Замена серина 339 на аланин приводит к торможению реакции  $\beta$ -элиминирования на стадии отрыва C- $\alpha$ -протона внешнего альдимида. Поскольку в ПДФ-зависимых реакциях  $\beta$ -элиминирования серосодержащих аминокислот Lys210 постулируется как общий кислотный катализатор [54], возможно, гидроксильная группа Ser339 обеспечивает оптимальные для катализа положение и основность Lys210.

Ранее подобную роль остатка серина, соответствующего Ser339 МГЛ, предложили для двух ферментов структурного подкласса, к которому принадлежит МГЛ, цистатионин- $\gamma$ -синтазы [58] и цистатионин- $\beta$ -лиазы [59].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано участие остатка Ser339 в механизме реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования, катализируемых МГЛ из *C. freundii*. Используя рентгеноструктурные, кинетические и спектральные данные, установлено, что Ser339 необходим для обеспечения оптимального положения боковой группы Lys210 на стадии отрыва C- $\alpha$ -протона субстрата в реакции  $\beta$ -элиминирования и стадиях отрыва C- $\alpha$ - и C- $\beta$ -протонов субстрата в реакции  $\gamma$ -элиминирования. Предположено, что в реакции  $\gamma$ -элиминирования остаток Ser339 обеспечивает необходимую основность боковой аминокислотной группы Lys210 на стадии 1,3-прототропного сдвига C- $\alpha$ -протона субстрата к C4'-атому кофермента. Понимание механизмов реакций  $\gamma$ - и  $\beta$ -элиминирования, катализируемых МГЛ, не только вносит вклад в фундаментальную энзимологию, оно необходимо для создания новых антибактериальных и противоопухолевых препаратов, основанных на изменении/улучшении субстратной и реакционной специфичности фермента. ●

*Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований государственных академий наук (№ 01201363820) и при поддержке РФФИ (проекты № 14-04-00349 и 14-04-31398).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Onuffer J.J., Kirsch J.F. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 9. P. 1750–1757.
- Vacca R.A., Giannattasio S., Capitani G., Marra E., Christen P. // *BMC Biochem.* 2008. V. 9. P. 17.
- Golinelli-Pimpaneau B., Lüthi C., Christen P. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 33. P. 23969–23977.
- Belogurov A. Jr., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays.* 2009. V. 31. № 11. P. 1161–1171.
- Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87–95.
- Tanaka H., Esaki N., Soda K. // *Enzyme Microb. Technol.* 1985. V. 7. P. 530–537.
- Фалеев Н.Г., Троицкая М.В., Ивойлов В.С., Карпова В.В., Беликов В.М. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1994. Т. 30. № 3. С. 458–463.
- Tokoro M., Asai T., Kobayashi S., Takeuchi T., Nozaki T. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 43. P. 42717–42727.
- Lockwood B., Coombs G. // *Biochem. J.* 1991. V. 279. № 3. P. 675–682.
- Kreis W., Hession C. // *Cancer Res.* 1973. V. 33. № 8. P. 1862–1865.
- Yoshimura M., Nakano Y., Yamashita Y., Oho T., Saito T., Koga T. // *Infection Immunity.* 2000. V. 68. № 12. P. 6912–6916.
- Nakayama T., Esaki N., Lee W.-J., Tanaka I., Tanaka H., Soda K. // *Agric. Biol. Chem.* 1984. V. 48. P. 2367–2369.
- Ревтович С.В., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Демидкина Т.В. // *ДАН.* 2012. Т. 445. № 2. С. 214–220.
- Kulikova V.V., Morozova E.A., Revtovich S.V., Kotlov M.I., Anufrieva N.V., Bazhulina N.P., Raboni S., Faggiano S., Gabellieri E., Cion P., et al. // *IUBMB Life.* 2017. V. 69. № 9. P. 668–676.
- El-Sayed A.S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. № 2. P. 445–467.
- Goyer A., Collakova E., Shachar-Hill Y., Hanson A.D. // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. № 2. P. 232–242.
- Morozova E.A., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Kulikova V.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. № 11. P. 3034–3042.
- Ануфриева Н.В., Морозова Е.А., Куликова В.В., Бажулина Н.П., Манухов И.В., Дёгтев Д.И., Гнучих Е.Ю., Родионов А.Н., Завильгельский Г.Б., Демидкина Т.В. // *Acta Naturae.* 2015. Т. 7. № 4 (27). С. 141–148.
- Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Revtovich S.V., Chernov A.S., Telegin G.B., Morozova E.A., Demidkina T.V. // *IUBMB Life.* 2016. V. 68. № 10. P. 830–835.
- Morozova E.A., Kulikova V.V., Rodionov A.N., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Demidkina T.V. // *Biochimie.* 2016. V. 128–129. P. 92–98.
- Куликова В.В., Чернуха М.Ю., Морозова Е.А., Ревтович С.В., Родионов А.Н., Коваль В.С., Аветисян Л.Р., Кулястова Д.Г., Шагинян И.А., Демидкина Т.В. // *Acta Naturae.* 2018. Т. 10. № 3 (38). С. 83–87.
- Yoshioka T., Wada T., Uchida N., Maki H., Yoshida H., Ide N., Kasai H., Hojo K., Shono K., Maekawa R., et al. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 12. P. 2583–2587.

23. Miki K., Al-Refaeie W., Xu M., Jiang P., Tan Y., Bouvet M., Zhao M., Gupta A., Chishima T., Shimada H., et al. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. № 10. P. 2696–2702.
24. Tan Y., Xu M., Hoffman R.M. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. № 4. P. 1041–1046.
25. Hoffman R.M. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015. V. 15. № 1. P. 21–31.
26. Käck H., Sandmark J., Gibson K., Schneider G., Lindqvist Y. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 291. № 4. P. 857–876.
27. Mamaeva D.V., Morozova E.A., Nikulin A.D., Revtovich S.V., Nikonov S.V., Garber M.B., Demidkina T.V. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2005. V. 61. № 6. P. 546–549.
28. Nikulin A., Revtovich S., Morozova E., Nevskaya N., Nikonov S., Garber M., Demidkina T. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2008. V. D64. № 2. P. 211–218.
29. Revtovich S.V., Faleev N.G., Morozova E.A., Anufrieva N.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *Biochimie.* 2014. V. 101. P. 161–167.
30. Kuznetsov N.A., Faleev N.G., Kuznetsova A.A., Morozova E.A., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Nikulin A.D., Fedorova O.S., Demidkina T.V. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 1. P. 671–681.
31. Revtovich S.V., Morozova E.A., Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Osipova T.I., Koval V.S., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *BBA-Proteins Proteom.* 2017. V. 1865. № 9. P. 1123–1128.
32. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Хурс Е.Н., Закомырдина Л.Н., Никулин А.Д., Демидкина Т.В., Хомутов Р.М. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. № 5. С. 690–698.
33. Nagai S., Flavin M. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. № 17. P. 3884–3895.
34. Morneau D.J.K., Abouassaf E., Skanes J.E., Aitken S.M. // *Anal. Biochem.* 2012. V. 423. № 1. P. 78–85.
35. Манухов И.В., Мамаева Д.В., Морозова Е.А., Расторгуев С.М., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В., Завильгельский Г.Б. // *Биохимия.* 2006. Т. 71. № 4. С. 454–463.
36. Морозова Е.А., Бажулина Н.П., Ануфриева Н.В., Ткачев Я.В., Стрельцов С.А., Тимофеев В.П., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. № 10. С. 1435–1445.
37. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
38. Cleland W.W. // *Methods Enzymol.* 1979. V. 63. P. 103–138.
39. Фалеев Н.Г., Рувинов С.Б., Бахмутов В.И., Демидкина Т.В., Мягких И.В., Беликов В.М. // *Молекуляр. биология.* 1987. Т. 21. С. 1636–1644.
40. Koulikova V.V., Zakomirdina L.N., Gogoleva O.I., Tsvetkova M.A., Morozova E.A., Komissarov V.V., Tkachev Y.V., Timofeev V.P., Demidkina T.V., Faleev N.G. // *Amino Acids.* 2011. V. 41. № 5. P. 1247–1256.
41. Kainosho M., Ajisaka K., Kamisaku M., Murai A., Kyogoku Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. V. 64. № 1. P. 425–432.
42. Morino Y., Snell E.E. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. № 23. P. 5591–5601.
43. Peterson E.A., Sober H.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1954. V. 76. P. 169–175.
44. Osterman A.L., Brooks H.B., Rizo J., Phillips M.A. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 15. P. 4558–4567.
45. Scatchard G. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1949. V. 51. P. 660–672.
46. Kabsch W. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. № 2. P. 125–132.
47. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D., Dodson E.J., Emsley P., Evans P.R., Keegan R.M., Krissinel E.B., Leslie A.G., McCoy A., et al. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2011. V. 67. № 2. P. 235–242.
48. Adams P.D., Grosse-Kunstleve R.W., Hung L.-W., Ioerger T.R., McCoy A.J., Moriarty N.W., Read R.J., Sacchettini J.C., Sauter N.K., Terwilliger T.C. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2002. V. 58. № 11. P. 1948–1954.
49. Emsley P., Lohkamp B., Scott W., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. № 4. P. 486–501.
50. Brzovic P., Holbrook E.L., Greene R.C., Dunn M.F. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 2. P. 442–451.
51. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.D., Messerschmidt A. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 262. № 2. P. 202–224.
52. Davis L., Metzler D. *The Enzymes.* 3rd Edn. V. 7 / Ed. Boyer P.D. N.Y.: Acad. Press, 1972. P. 33–74. <https://www.elsevier.com/books/the-enzymes/boyer/978-0-12-122707-4>
53. Clausen T., Huber R., Prade L., Wahl M.C., Messerschmidt A. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 23. P. 6827–6838.
54. Messerschmidt A., Worbs M., Steegborn C., Wahl M.C., Huber R., Laber B., Clausen T. // *Biol. Chem.* 2003. V. 384. № 3. P. 373–386.
55. Inou H., Inagaki K., Adachi N., Tamura T., Esaki N., Soda K., Tanaka H. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. № 11. P. 2336–2343.
56. Sato D., Shiba T., Karaki T., Yamagat W., Nozaki T., Nakazawa T., Harada S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4874.
57. Anufrieva N.V., Faleev N.G., Morozova E.A., Bazhulina N.P., Revtovich S.V., Timofeev V.P., Tkachev Y.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1854. № 9. P. 1220–1228.
58. Jaworski A.F., Lodha P.H., Manders A.L., Aitken S.M. // *Protein Sci.* 2012. V. 21. № 11. P. 1662–1671.
59. Lodha P.H., Aitken S.M. // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 45. P. 9876–9885.

УДК 616-006.484.04

# Сигнальные пути, определяющие эффективность терапии глиобластомы вирусом осповакцины

Н. С. Васильева\*, А. Б. Агеенко, В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, 630090 Россия

\*E-mail: nataly\_vas@bk.ru

Поступила в редакцию 29.10.2021

Принята к печати 16.03.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11623

**РЕФЕРАТ** Резистентность глиобластомы к существующим методам терапии лимитирует выживаемость и повышение качества жизни пациентов с данным диагнозом. Для разработки эффективных способов лечения глиобластомы необходимо знать механизмы, определяющие устойчивость опухоли к терапевтическим агентам. Виротерапия относится к наиболее активно развивающимся подходам к лечению злокачественных новообразований, в том числе глиобластом. Ранее мы показали, что рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact обладает цитотоксической активностью *in vitro* и противоопухолевой эффективностью *in vivo* в отношении глиобластомы человека. Однако исследованные культуры клеток глиобластомы обладали разной чувствительностью к онкотоксическому действию вируса. С помощью метода проточной цитометрии мы определили представленность поверхностных маркеров стволовых опухолевых клеток на клетках глиобластомы с различной чувствительностью к VV-GMCSF-Lact, а также методом вестерн-блот-анализа оценили уровень белков, способных влиять на проникновение вируса в клетки и на эффективность вирусной инфекции. Мы показали, что в культурах клеток, более чувствительных к VV-GMCSF-Lact, регистрируется большее количество клеток, несущих маркеры стволовых опухолевых клеток, и более низкий уровень активированной киназы Akt. Akt, вероятно, ингибирует апоптоз, индуцируемый лактаптином в клетках, устойчивых к вирусу. Таким образом, можно предположить, что чувствительность клеток глиобластомы к онкотоксическому действию VV-GMCSF-Lact определяется характером и степенью нарушений процессов регуляции гибели клеток различных культур. Дополнительное изучение факторов, влияющих на устойчивость глиобластомы к виротерапии, позволит проверить эту гипотезу и выявить мишени для противоопухолевой терапии, комбинированной с VV-GMCSF-Lact.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** глиобластома, механизмы резистентности глиобластомы, онколитические вирусы, стволовые опухолевые клетки, VV-GMCSF-Lact.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** СОК – стволовые опухолевые клетки; Akt – серин/треонинкиназа 1; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; PAK1 – p21-активированная киназа; MEM – Minimum Essential Medium (среда Игла); FBS – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота; CD15 (Lewis X) – 3-фукозил-N-ацетиллактозамин; CD171 – молекула адгезии нейтральных клеток L1 (L1CAM); PE – фикоэритрин; IC<sub>50</sub> – концентрация вируса, вызывающая гибель 50% клеток; CD133 – проминин-1; CD44 – интегральный клеточный гликопротеин; VACV – вирус осповакцины.

## ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома – наиболее злокачественная опухоль центральной нервной системы – характеризуется низкой выживаемостью пациентов. Стандартная терапия глиобластомы, включающая максимально возможную резекцию опухоли с последующей радио- и/или химиотерапией, не позволяет улучшить качество жизни и увеличить выживаемость пациентов с данным диагнозом.

Основную проблему для эффективного лечения глиобластомы представляет резистентность опухоли к существующим методам терапии. На сегодняшний день научно-медицинское сообщество разрабатывает и продвигает различные подходы к терапии глиобластомы, основанные на ингибировании таргетных молекул, иммунотерапии и других методах. Активно развивается такой подход к иммунотерапии опухолей, в том числе глиом,

как терапия с помощью онколитических вирусов [1].

Ранее коллективом авторов ИХБФМ СО РАН и ГНЦ ВВ «Вектор» был создан рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact. VV-GMCSF-Lact содержит делеции фрагментов генов тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены гены ГМ-КСФ и онкотоксического белка лактапина. Делеция этих генов снижает вирулентность вируса по отношению к здоровым клеткам и значительно повышает его селективность по отношению к онкотрансформированным. Экспрессия ГМ-КСФ способствует развитию противоопухолевого иммунного ответа, в то время как экспрессия лактапина, фрагмента каппа-казеина молока человека, индуцирует апоптотическую гибель опухолевых клеток. Ранее было показано, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток человека различного гистогенеза *in vitro* и значительной противоопухолевой эффективностью в отношении рака молочной железы и глиобластомы человека *in vivo* [2, 3].

Однако клетки различных культур глиобластомы как иммортализованных, так и полученных из образцов опухолей пациентов (персонализированные культуры) обладают разной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact. Известно, что глиобластомы характеризуются межопухолевой и внутриопухолевой гетерогенностью. Некоторые молекулярные подтипы глиобластомы, например proneйральный, более чувствительны к радиотерапии и химиотерапии темозоламидом, однако определенные типы этого новообразования, в частности мезенхимальный молекулярный подтип, устойчивы к стандартной терапии [4, 5]. При этом вопрос о формировании резистентности опухолевых клеток к вирусной терапии остается открытым [6, 7].

Вирус осповакцины, на основе которого создан препарат VV-GMCSF-Lact, способен проникать в клетки-мишени путем слияния с клеточной мембраной либо (при низких значениях pH) с мембранами эндосом [8, 9]. Показано также, что фосфатидилсерин, представленный на мембране вирусных частиц, позволяет вирусу проникать в клетку посредством макропиноцитоза за счет мимикрии под апоптотические тельца [10]. Эти способы проникновения требуют перестройки цитоскелета клетки-мишени и, соответственно, их эффективность может зависеть от состояния различных клеточных сигнальных путей, таких, например, как путь PI3K/Akt. Кроме того, на всех этапах макропиноцитоза необходима p21-активированная киназа RAK1, которая участвует в реорганизации цитоскелета и динамике микротрубочек [11].

В данной работе мы исследовали факторы, обуславливающие эффективность цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact в отношении клеток культур глиобластомы, обладающих разной чувствительностью к действию вируса. Мы оценили представленность маркеров стволовых опухолевых клеток (СОК) глиобластомы в клетках иммортализованных линий U87 MG и U343 MG и персонализированных культур BR1.20 и BR3.20, а также определили уровень белков, способных влиять на эффективность вирусной инфекции в опухолевых клетках – элементов сигнального пути PI3K/Akt и RAK1. Показано, что в культурах клеток глиобластомы, чувствительных к онкотоксическому действию VV-GMCSF-Lact, детектируется большее количество клеток, несущих маркеры СОК, а также более низкий (по сравнению с устойчивыми клетками) уровень активированной протеинкиназы Akt, способной ингибировать апоптоз, индуцируемый лактапином.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культивирование клеток глиобластомы

Культуры клеток глиобластомы человека U87 MG, U343 MG, BR1.20 и BR3.20 получены из коллекции культур клеток ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Клетки иммортализованных культур U87 MG и U343 MG культивировали в среде альфа-MEM с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамин и раствора антибиотиков-антимикотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.25 мкг/мл амфотерицина).

Клетки персонализированных культур BR1.20 и BR3.20 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS, 4 mM L-глутамин и раствора антибиотиков-антимикотиков (200 ед./мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.5 мкг/мл амфотерицина).

Все культуры содержали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37.0 ± 1.0°C в атмосфере 5.0 ± 0.5% CO<sub>2</sub>.

### Проточная цитометрия

Клетки, достигшие 60–80% монослоя, собирали с культурального пластика и инкубировали с моноклональными антителами к CD15 человека, конъюгированными с Alexa Fluor 647 (R&D Systems, США), и с моноклональными антителами к CD171 человека, конъюгированными с PE (R&D Systems), согласно протоколу производителя. Анализ проводили с использованием проточного цитометра FACSCantoII (BD Biosciences, США). Данные ана-



лизировали с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences).

### Вестерн-блот-анализ

Уровни белков p85α и p110α, pAkt<sup>Ser473</sup>, pAkt<sup>Thr308</sup> и pRAK1<sup>Ser199/204</sup> до и после воздействия вируса (через 0,5, 1, 2, 6 и 12 ч) оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа. Множественность инфекции составляла 1 БОЕ/клетку.

Клетки инкубировали с вирусом, после этого получали клеточные лизаты с использованием RIPA-буфера (1% NP40, 150 мМ NaCl, 0,1% SDS, 50 мМ Трис-НСl, рН 7,4) в присутствии ингибиторов протеаз и фосфатаз (Pierce Phosphatase Inhibitors Mini Tablets, Thermo Scientific, США), cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию белка в полученных лизатах определяли с использованием коммерческого набора Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific) согласно протоколу производителя. Белки разделяли с помощью электрофореза в денатурирующем 10% полиакриламидном геле с использованием камеры для вертикального электрофореза. «Мокрый» перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм) осуществляли в буфере для переноса NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen, США) при постоянном токе 400 мА в течение 1 ч. Обработку мембран антителами осуществляли с использованием инкубатора для нитроцеллюлозной мембраны IBind Western Device (Bio-Rad, США). Белки детектировали с использованием набора реагентов Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen) и системы для хемилюминесцентной детекции Amersham™ Imager 600. Для нормирования мембраны окрашивали рекомбинантными моноклональными антителами кролика к β-актину.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Популяция CD15 и CD171 положительных клеток в культурах U87 MG, U343 MG, BR1.20 и BR3.20 глиобластомы человека

Ранее нами было показано, что рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact с делециями фрагментов генов вирусных тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены гены ГМ-КСФ человека и онкотоксического белка лактапина соответственно, обладает высокой цитотоксической активностью и противоопухолевой эффективностью в отношении клеток как иммортализованных культур глиобластомы человека, так и в отношении клеток культур, полученных из образцов опухолей пациентов. При этом клет-

Таблица 1. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиомы

Культура клеток	IC <sub>50</sub> *, БОЕ/кл
U87 MG	0.1
U343 MG	0.06
BR1.20	0.006
BR3.20	0.02

\*IC<sub>50</sub> – концентрация вируса, вызывающая гибель 50% клеток.

ки исследуемых культур обладали разной чувствительностью к действию вируса [3].

В данной работе мы исследовали некоторые факторы, способные влиять на эффективность воздействия вируса на опухолевые клетки. С этой целью использовали иммортализованные линии глиобластомы U87 MG и U343 MG, а также культуры, полученные из образцов опухолей пациентов (персонализированные культуры) BR1.20 и BR3.20. Исследуемые клетки обладают разной чувствительностью к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact (табл. 1).

Различия в цитотоксическом эффекте вируса на клетки могут быть связаны, в первую очередь, с различиями в происхождении исследуемых культур клеток. Известно, что глиобластомы представляют гетерогенную группу злокачественных образований с зачастую несхожим ответом на терапию [12]. Кроме того, новообразования этого типа характеризуются внутриопухолевыми отличиями на молекулярном уровне и сложной организацией на клеточном [13]. Согласно иерархической модели, СОК глиобластомы находятся на вершине иерархии и вносят значительный вклад в устойчивость опухоли к терапии [14]. Например, сигнальный путь Notch, играющий важную роль в поддержании фенотипа СОК, вносит вклад в формирование резистентности этих клеток к радиотерапии посредством активации путей PI3K/Akt и Vcl-2, важных регуляторов роста и выживания клеток [15]. Ранее мы показали, что культуры глиобластомы, характеризующиеся большей чувствительностью к VV-GMCSF-Lact, содержат больше клеток CD133+ и CD133+/CD44+ (рис. 1) [3].

С помощью проточной цитометрии мы оценили представленность других маркеров СОК: CD15 и CD171 [16, 17] в клетках культур U87 MG, U343 MG, BR1.20 и BR3.20, обладающих различной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact (рис. 2).

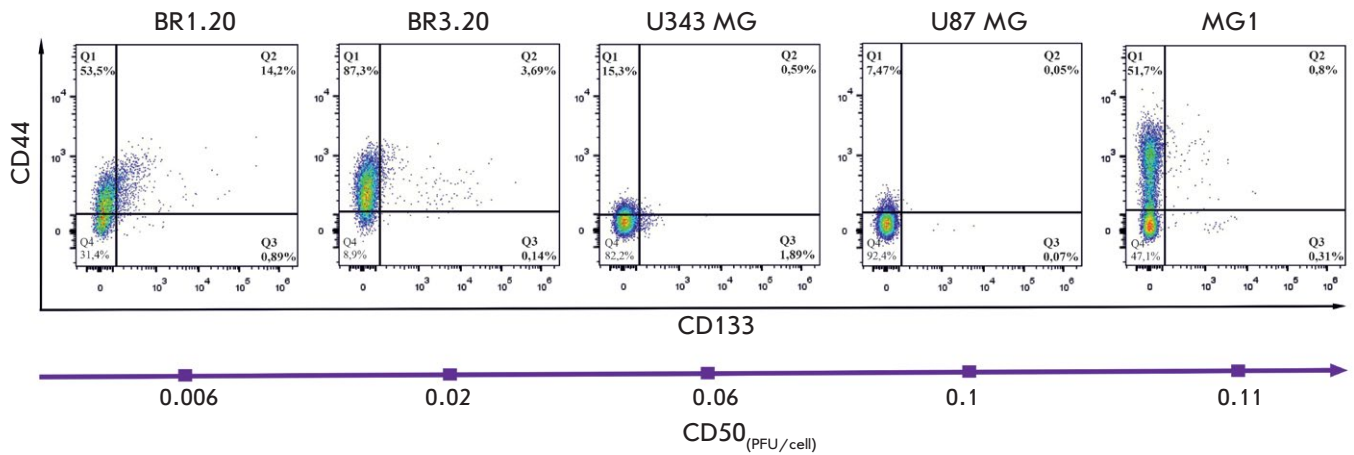


Рис. 1. Профили экспрессии CD133 и CD44 и их совместная экспрессия в культурах клеток MG1, BR1.20, BR3.20, U343 MG и U87 MG. Суспензии клеток инкубировали с PE-конъюгированными анти-CD133 и APC-конъюгированными анти-CD44-антителами и анализировали с помощью проточной цитометрии. Верхние квадранты (Q1, Q2) – популяция CD44-положительных клеток; правые квадранты (Q2, Q3) – популяция CD133-положительных клеток. Клетки, положительные по обоим маркерам, представлены в правом верхнем квадранте (Q2). Фиолетовой стрелкой обозначено снижение чувствительности клеток исследуемых культур к VV-GMCSF-Lact [3]

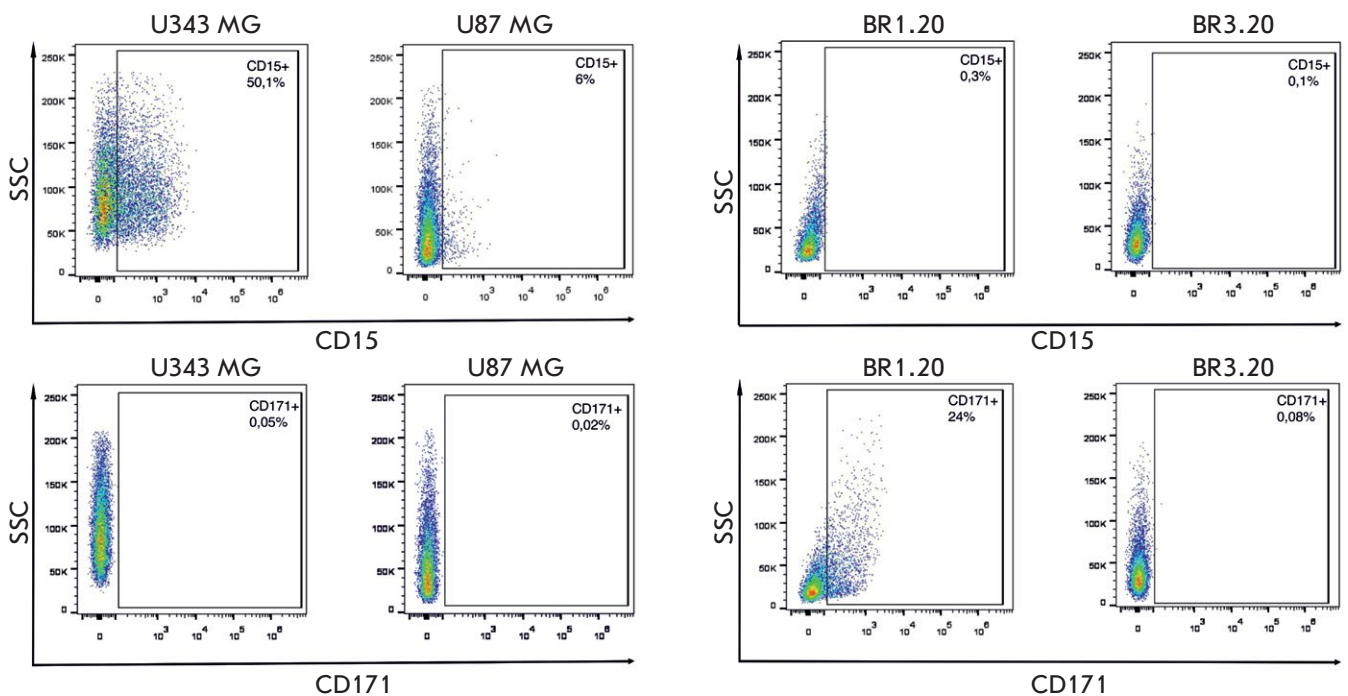


Рис. 2. Представленность маркеров CD15 и CD171 в культурах клеток U87 MG, U343 MG, BR1.20 и BR3.20. Суспензии клеток инкубировали с PE-конъюгированными анти-CD171 и FITC-конъюгированными анти-CD15-антителами и анализировали с помощью проточной цитометрии

Маркер CD15, также известный как SSEA-1, или Lewis X, – это углеводная молекула адгезии, широко представленная на многих типах плюрипотентных стволовых клеток [18]. В нашем исследовании CD15-положительные клетки представлены в иммортализованных культурах U87 MG и U343 MG в количестве 6 и 50.1% соответственно. При этом ко-

личество CD133-положительных клеток в этих культурах было либо значительно ниже, либо такие клетки не детектировались [3]. В 2009 году M. Son и соавт. показали, что культуры клеток глиобластомы, полученные из образцов опухолей пациентов, могут не содержать CD133-положительных стволовых опухолевых клеток. Однако в этих культурах представ-

лены клетки со свойствами, сходными со свойствами стволовых клеток и обладающие опухолевым потенциалом при трансплантации иммунодефицитным мышам [19]. Таким образом, маркер CD15 можно рассматривать как альтернативный вариант CD133 для выделения и характеристики стволовых клеток глиобластомы.

Маркер CD171, или L1CAM, относится к семейству иммуноглобулин-подобных молекул клеточной адгезии, он играет важную роль в развитии нейральных клеток, выживаемости и миграции опухолевых клеток [20, 21]. Известно, что в клетках глиобластомы CD171 опосредует развитие радио- и химиорезистентности [22, 23]. Стоит отметить, что культура BR1.20, единственная из исследуемых культур, содержит CD171-позитивные клетки.

Таким образом, наиболее чувствительной к действию VV-GMCSF-Lact оказалась культура BR1.20, клетки которой отличаются более высоким содержанием не только маркеров CD133 и CD44, но и CD171, который участвует в поддержании выживания и клоногенности CD133-позитивных СОК за счет позитивной регуляции Olig2, ведущей к снижению экспрессии опухолевого супрессора p21 [24]. CD133, известный как промнин-1, играет важную роль в клеточном росте, пролиферации и патофизиологии опухолей [25]. Также показано, что популяция CD133+ клеток устойчива к радиотерапии за счет более эффективной работы системы репарации [26]. Фосфорилирование цитоплазматического домена CD133 приводит к его связыванию с p85, регуляторной субъединицей PI3K, и последующей активации сигнального пути PI3K/Akt [27]. Согласно опубликованным данным, активация сигнального пути PI3K/Akt является одним из ведущих процессов, обуславливающих эффективность проникновения вирусных частиц VACV в клетку и репликацию вируса на ранних этапах инфекции [28–30].

#### **Уровни белков p85α и p110α, pAkt<sup>Ser473</sup>, pAkt<sup>Thr308</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> в клетках U87 MG и U343 MG до и после воздействия вирусного препарата**

Вирус осповакцины способен проникать в клетку-хозяина как посредством полного слияния мембран и pH-зависимого эндоцитоза, так и по механизму макропиноцитоза за счет взаимодействия остатков фосфатидилсерина на вирусной мембране с рецепторами, ассоциированными (сопряженными) с G-белком клетки, что ведет к активации ниже лежащих сигнальных путей, таких, как PI3K/Akt, реорганизации цитоскелета клетки-хозяина и последующему проникновению вируса внутрь клетки. Показано, что ингибирование PI3K приводит к снижению количества проникших в клетку вирионов

[10]. Кроме того, на всех стадиях макропиноцитоза задействована P21-активированная киназа PAK1, перемещение которой на плазматическую мембрану приводит к активации множества эффекторов, необходимых для образования макропиносом [11].

Исследование уровня белков p85α и p110α (регуляторной и каталитической субъединиц PI3K) в клетках U87 MG и U343 MG показало, что относительный уровень этих белков как в контрольной точке, так и при увеличении времени инкубации с вирусом выше в клетках U343 MG, более чувствительных к действию VV-GMCSF-Lact (рис. 3, 4). Более высокий уровень p85α и p110α, вероятно, обуславливает образование большего количества гетеродимеров PI3K и, соответственно, активацию сигнального каскада PI3K/Akt, который (согласно опубликованным данным) участвует не только в проникновении вируса осповакцины в клетку, но и необходим на ранних стадиях репликации вируса [28]. Кроме того, наиболее чувствительные к вирусу клетки U343 MG имеют более высокий уровень pAkt<sup>Ser473</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> (аутофосфорилирование PAK1 по данным сайтам предотвращает переход киназы в неактивную конформацию [31]). При этом с увеличением времени инкубации клеток обеих линий с вирусом уровни данных белков возрастали. Показано, что PAK1 участвует в реорганизации цитоскелета и динамике микротрубочек, опосредуя блеббинг клеточной мембраны [32], а ингибирование этого фермента снижает эффективность инфицирования клеток вирусом осповакцины [10]. Фосфорилирование Akt по серину в положении 473 осуществляет комплекс mTORC2 [33]. Известно, что консервативный белок поксвируса F17, секвестрируя Raptor и Rictor, нарушает регуляцию mTOR, что ведет к сверхактивации комплекса mTORC2 [34]. Таким образом, можно предположить, что более высокий уровень pAkt<sup>Ser473</sup> в чувствительных к VV-GMCSF-Lact клетках U343 MG свидетельствует о более эффективном проникновении вируса в клетки, опосредованном PI3K и PAK1. Однако стоит отметить, что для полной активации Akt необходимо ее фосфорилирование по остатку треонина в положении 308. При взаимодействии остатков фосфатидилсерина, локализованных на вирусной мембране, с рецепторами, ассоциированными (сопряженными) с G-белком клетки-хозяина, формируются гетеродимеры p85-p110 (PI3K). Впоследствии PI3K превращает фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PIP2) в фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3). После связывания плекстрин-подобного домена Akt с PIP3 Akt фосфорилируется по Thr308 киназой PDK1 [35, 36]. Уровень фосфорилированной Akt был выше в клетках U87 MG, более устойчивых к дей-

ствию VV-GMCSF-Lact как в контрольной точке, так и при увеличении времени инкубации с вирусом, что может свидетельствовать о более высоком уровне полностью активированной Akt в данных клетках. Фосфорилированная по обоим сайтам Akt активирует комплекс mTORC1 как косвенно, через инактивацию TSC2, так и напрямую, посредством фосфорилирования PRAS40 [37]. Эти процессы приводят к увеличению синтеза белка и блокированию системы апоптоза. Akt регулирует апоптотические процессы, ингибируя каспазы-9 и -3 [38]. При этом лактаптин, экспрессируемый VV-GMCSF-Lact, индуцирует апоптотическую гибель клеток по митохондриальному пути. Показано, что инкубация клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с рекомбинантным аналогом лактапина

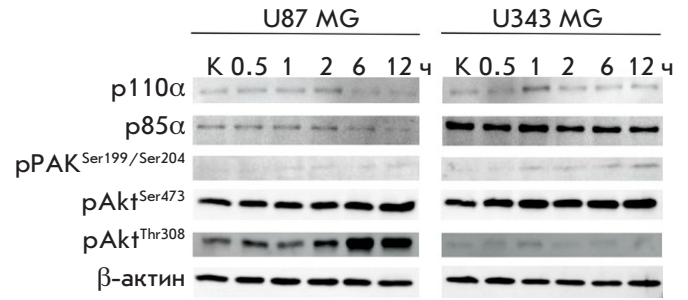


Рис. 3. Содержание белков p85α и p110α, pAkt<sup>Ser473</sup>, pAkt<sup>Thr308</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> в клетках иммортализованных культур U87 MG и U343 MG. Вестерн-блот. Дорожки: К – лизаты контрольных клеток; 0,5, 1, 2, 6 и 12 ч – лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение различных промежутков времени

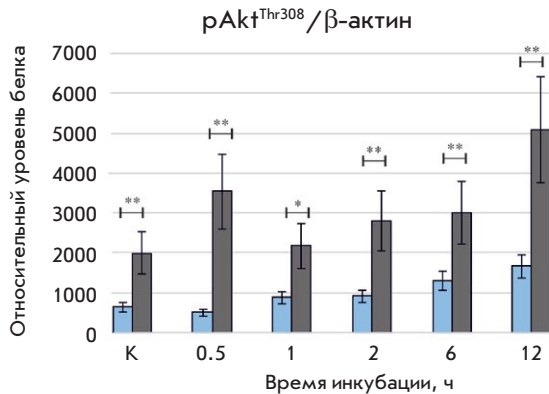
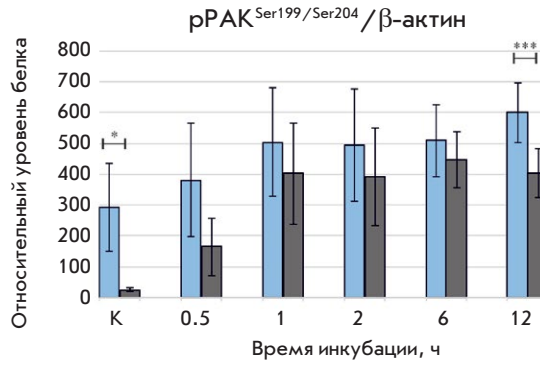
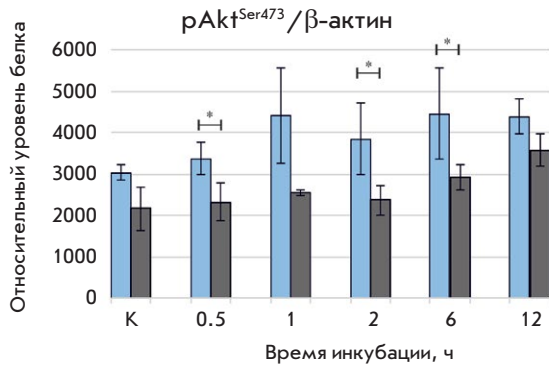
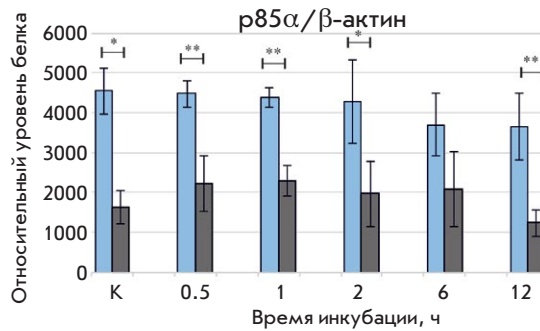
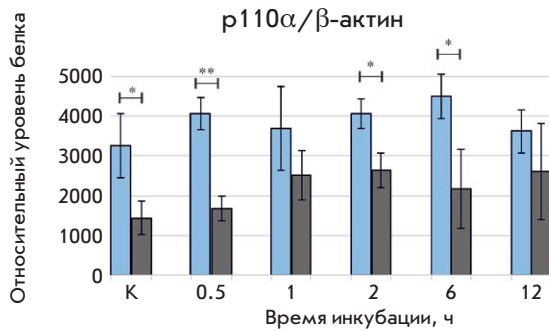


Рис. 4. Относительные уровни белков p85α и p110α, pAkt<sup>Ser473</sup>, pAkt<sup>Thr308</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> в клетках иммортализованных культур U87 MG и U343 MG до и после инкубации с VV-GMCSF-Lact (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001)



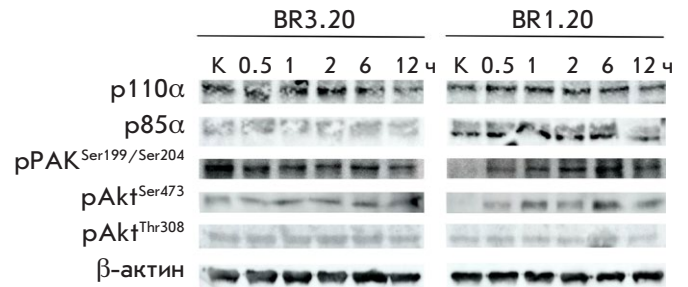
RL2 приводит к увеличению в них уровня активной формы каспазы-9 [39]. Таким образом, устойчивость клеток глиобластомы U87 MG к действию VV-GMCSF-Lact может быть обусловлена активностью киназы Akt, которая ингибирует апоптоз, индуцируемый лактапином.

**Уровни белков p85α и p110α, pAkt<sup>Ser473</sup>, pAkt<sup>Thr308</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> в клетках BR1.20 и BR3.20**

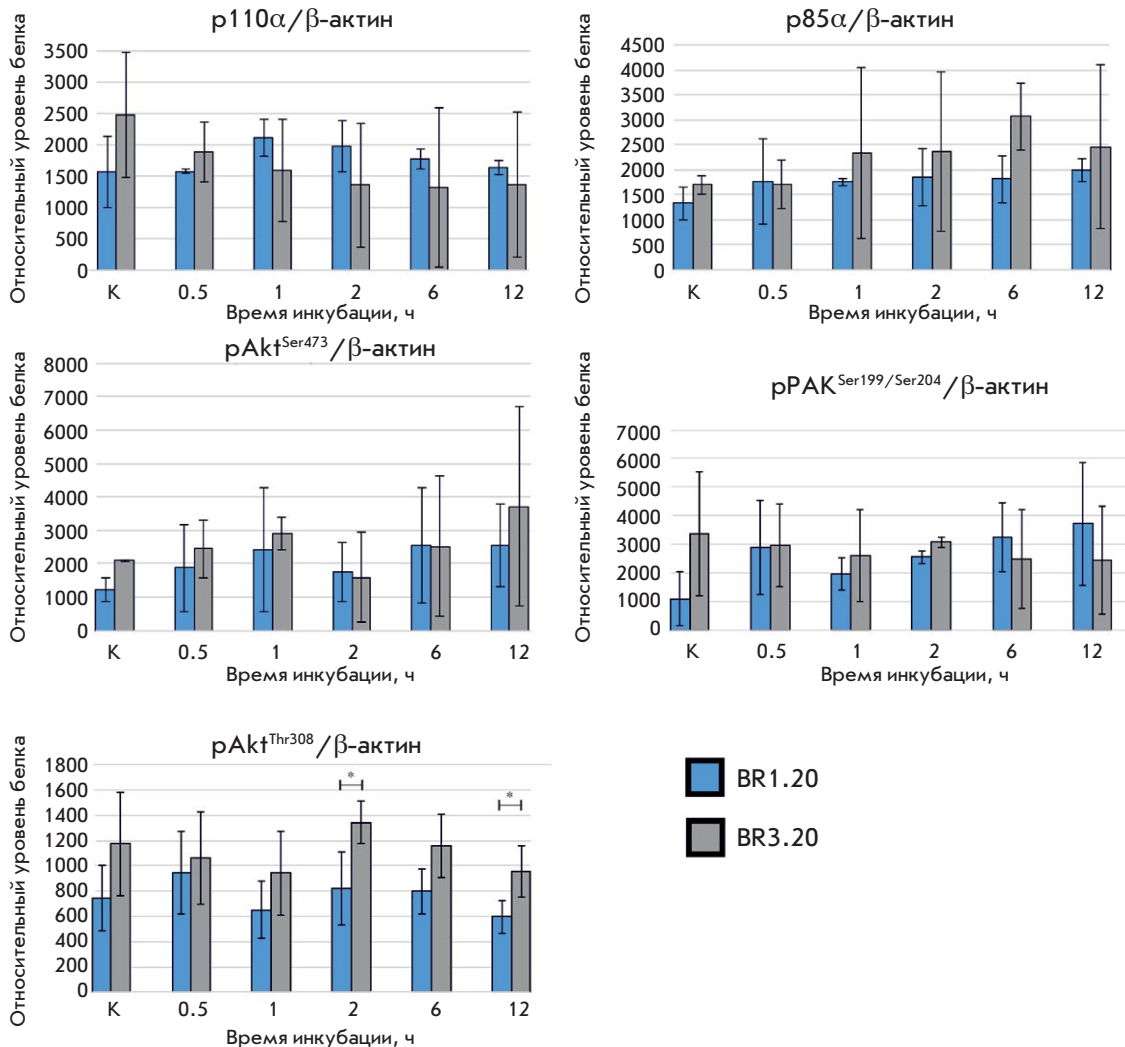
**до и после воздействия вирусного препарата**

Уровни белков p85α и p110α в клетках BR1.20 и BR3.20 изменялись в зависимости от продолжительности инкубации с вирусом (рис. 5, 6). В клетках BR1.20 уровень p85α незначительно повышался к 12 ч инкубации, в клетках BR3.20 – повышался к 6 ч инкубации, а затем снижался к 12 ч. Уровень p110α в клетках BR1.20 в среднем оставался на одном уровне в течение 12 ч инкубации, а в клетках BR3.20 снижался к 12 ч. При этом в более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact клетках BR3.20

уровень p110α в контрольной точке (клетки без воздействия вируса) был выше. Уровень PAK1 в более чувствительных клетках BR1.20 повышался



**Рис. 5.** Анализ содержания белков p85α и p110α, pAkt<sup>Ser473</sup>, pAkt<sup>Thr308</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> в клетках персонализированных культур BR1.20 и BR3.20. Вестерн-блот. Дорожки: К – лизаты контрольных клеток; 0.5, 1, 2, 6 и 12 ч – лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение различных промежутков времени



**Рис. 6.** Относительные уровни белков p85α и p110α, pAkt<sup>Ser473</sup>, pAkt<sup>Thr308</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> в клетках персонализированных культур BR1.20 и BR3.20 до и после инкубации с VV-GMCSF-Lact. (\*p < 0.05)

к 0.5 ч инкубации с вирусом, затем снижался к 1 ч и снова возрастал к 12 ч. В то же время в клетках BR3.20 уровень PAK1 снижался к 1 ч инкубации с VV-GMCSF-Lact, возрастал к 2 ч и снова снижался к 12 ч. Количество pAkt<sup>Ser473</sup> в клетках обеих культур возрастало к 1 ч инкубации, снижалось к 2 ч и снова возрастало к 12 ч. Уровень pAkt<sup>Thr308</sup> напротив снижался к 1 ч, повышался к 2 ч и снова снижался к 12 ч инкубации в клетках обеих культур (рис. 5, 6). Однако к 2 и 12 ч инкубации с VV-GMCSF-Lact уровень pAkt<sup>Thr308</sup> был значительно выше в более устойчивых к действию вируса клетках BR3.20. Таким образом, определение уровня описанных белков показало, что уровни p85α и p110α (регуляторная и каталитическая субъединицы PI3K соответственно), pAkt<sup>Ser473</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> изменяются со временем инкубации, не различаясь существенно в клетках BR1.20 и BR3.20. Однако важно отметить, что уровень pAkt<sup>Thr308</sup> в клетках BR3.20, более устойчивых к действию вируса, был выше и достоверно отличался от уровня pAkt<sup>Thr308</sup> в клетках BR1.20 к 2 и 12 ч инкубации с вирусом.

Таким образом, молекулярные механизмы, регулирующие активацию PI3K и PAK1 и последующее проникновение вируса в опухолевые клетки, могут значительно различаться в разных клеточных моделях глиобластомы: в клетках иммортализованных и персонализированных культур. В процессы, опосредующие эффективность проникновения вируса осповакцины в клетку, могут быть вовлечены и другие молекулярные события. Например, клетки глиобластомы часто содержат делеции или мутации в гене опухолевого супрессора PTEN, который в свою очередь ингибирует активацию Akt [40, 41]. Также показано, что в клетках глиобластомы на высоком уровне экспрессируется PDK1, которая может активировать PAK1 и вовлечена в процессы реорганизации цитоскелета [42–44].

При этом эффективность проникновения VV-GMCSF-Lact в клетки глиобластомы не означает, что вирус проявляет выраженное онкотоксическое действие, поскольку для достижения цитотоксического эффекта вирус должен успешно реплицироваться в клетке. VV-GMCSF-Lact содержит делеции в генах вирусной тимидинкиназы и ростового фактора, что не позволяет ему реплицироваться в здоровых, нормально делящихся клет-

ках. Однако опухолевые клетки также могут различаться уровнем ростовых факторов и других белков, необходимых для репликации вирусной ДНК и последующей сборки новых вирусных частиц, что будет определять противоопухолевую эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении разных опухолей.

На основании полученных данных мы можем заключить, что в клетках глиобластомы человека, устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, повышен уровень активированной киназы Akt, которая ингибирует митохондриальный путь апоптоза, что, вероятно, снижает эффективность цитотоксического действия рекомбинантного вируса, экспрессирующего трансген лактаптин – индуктор апоптоза по митохондриальному пути.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют предположить, что клетки глиобластомы человека, чувствительные к онколитическому вирусу VV-GMCSF-Lact, отличаются меньшей степенью нарушений в каскадах программируемой клеточной гибели.

Механизмы резистентности глиобластомы к стандартной терапии интенсивно изучаются. Однако на сегодняшний день вопрос о формировании устойчивости глиобластомы к онколитическим вирусам остается открытым [6, 7]. Механизмы действия вируса осповакцины, на основе которого создан рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact, достаточно хорошо изучены. Также изучены процессы, происходящие в клетке-хозяине при проникновении в нее патогена. Как известно, опухолевые клетки, в частности СОК, характеризуются нарушениями во многих сигнальных путях, в регуляции клеточного цикла и каскадах программируемой клеточной гибели. Детальное изучение механизмов, способных вносить вклад в эффективность терапии с помощью VV-GMCSF-Lact, позволит выявить возможные маркеры опухолей, чувствительных к вирусному препарату, а также вероятные мишени комбинированной с VV-GMCSF-Lact терапии. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90041, исследование частично поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tan A.C., Ashley D.M., López G.Y., Malinzak M., Friedman H.S., Khasraw M. // *CA Cancer J. Clin.* 2020. V. 70. № 4. P. 299–312.
2. Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A., Grazhdantseva A., Troitskaya O., Nushtaeva A., Tkachenko A., Kuligina

- E., Richter V., Koval O. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 45. P. 74171–74188.
3. Vasileva N., Ageenko A., Dmitrieva M., Nushtaeva A., Mishinov S., Kochneva G., Richter V., Kuligina E. // *Life.* 2021. V. 11. № 10. P. 1084.
4. Mao P., Joshi K., Li J., Kim S.-H., Li P., Santana-Santos L.,

- Luthra S., Chandran U.R., Benos P.V., Smith L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 21. P. 8644–8649.
5. Bhat K.P.L., Balasubramanian V., Vaillant B., Ezhilarasan R., Hummelink K., Hollingsworth F., Wani K., Heathcock L., James J.D., Goodman L.D., et al. // *Cancer Cell*. 2013. V. 24. № 3. P. 331–346.
6. Zhang Q., Liu F. // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 6. P. 485.
7. Raja J., Ludwig J.M., Gettinger S.N., Schalper K.A., Kim H.S. // *J. Immunother. Canc.* 2018. V. 6. № 1. P. 140.
8. Moss B. // *Virology*. 2006. V. 344. № 1. P. 48–54.
9. Sobhy H. // *Arch. Virol.* 2017. V. 162. № 12. P. 3567–3585.
10. Mercer J., Helenius A. // *Science*. 2008. V. 320. № 5875. P. 531–535.
11. Mercer J., Helenius A. // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. № 5. P. 510–520.
12. Bahadur S., Sahu A.K., Baghel P., Saha S. // *Oncol. Rev.* 2019. V. 13. № 2. P. 114–124.
13. Skaga E., Kuleskiy E., Brynjulvsen M., Sandberg C.J., Potdar S., Langmoen I.A., Laakso A., Gaál-Paavola E., Perola M., Wennerberg K., et al. // *Clin. Translat. Med.* 2019. V. 8. № 1. P. 33.
14. Prager B.C., Bhargava S., Mahadev V., Hubert C.G., Rich J.N. // *Trends Cancer*. 2020. V. 6. № 3. P. 223–235.
15. Wang J., Wakeman T.P., Lathia J.D., Hjelmeland A.B., Wang X.-F., White R.R., Rich J.N., Sullenger B.A. // *Stem Cells*. 2009. V. 28. № 1. P. 17–28.
16. Hassn Mesrati M., Behrooz A.B., Abuhamad Y.A., Syahir A. // *Cells*. 2020. V. 9. № 5. P. 1236.
17. Lauko A., Lo A., Ahluwalia M.S., Lathia J.D. // *Semin. Cancer Biol.* 2021. P. S1044579X21000493.
18. Capela A., Temple S. // *Neuron*. 2002. V. 35. № 5. P. 865–875.
19. Son M.J., Woolard K., Nam D.-H., Lee J., Fine H.A. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 5. P. 440–452.
20. Moos M., Tacke R., Scherer H., Teplow D., Früh K., Schachner M. // *Nature*. 1988. V. 334. № 6184. P. 701–703.
21. Mohanan V., Temburni M.K., Kappes J.C., Galileo D.S. // *Clin. Exp. Metastasis*. 2013. V. 30. № 4. P. 507–520.
22. Cheng L., Wu Q., Huang Z., Guryanova O.A., Huang Q., Shou W., Rich J.N., Bao S. // *EMBO J*. 2011. V. 30. № 5. P. 800–813.
23. Held-Feindt J., Schmelz S., Hattermann K., Mentlein R., Mehdorn H.M., Sebens S. // *Neurochem. Internat.* 2012. V. 61. № 7. P. 1183–1191.
24. Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 15. P. 6043–6048.
25. Li Z. // *Exp. Hematol. Oncol.* 2013. V. 2. № 1. P. 17.
26. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. // *Nature*. 2006. V. 444. № 7120. P. 756–760.
27. Wei Y., Jiang Y., Zou F., Liu Y., Wang S., Xu N., Xu W., Cui C., Xing Y., Liu Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 17. P. 6829–6834.
28. Soares J.A.P., Leite F.G.G., Andrade L.G., Torres A.A., De Sousa L.P., Barcelos L.S., Teixeira M.M., Ferreira P.C.P., Kroon E.G., Souto-Pradón T., et al. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 13. P. 6883–6899.
29. Diehl N., Schaal H. // *Viruses*. 2013. V. 5. № 12. P. 3192–3212.
30. El-Jesr M., Teir M., Maluquer de Motes C. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 568412.
31. Lei M., Lu W., Meng W., Parrini M.-C., Eck M.J., Mayer B.J., Harrison S.C. // *Cell*. 2000. V. 102. № 3. P. 387–397.
32. Meshki J., Douglas S.D., Hu M., Leeman S.E., Tuluc F. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 9. P. e25332.
33. Moore S.F., Hunter R.W., Hers I. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 28. P. 24553–24560.
34. Meade N., Furey C., Li H., Verma R., Chai Q., Rollins M.G., DiGiuseppe S., Naghavi M.H., Walsh D. // *Cell*. 2018. V. 174. № 5. P. 1143–1157.e17.
35. Alessi D.R., James S.R., Downes C.P., Holmes A.B., Gaffney P.R.J., Reese C.B., Cohen P. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. № 4. P. 261–269.
36. Manning B.D., Cantley L.C. // *Cell*. 2007. V. 129. № 7. P. 1261–1274.
37. Memmott R.M., Dennis P.A. // *Cell. Signal.* 2009. V. 21. № 5. P. 656–664.
38. Zhou H., Li X.-M., Meinkoth J., Pittman R.N. // *J. Cell Biol.* 2000. V. 151. № 3. P. 483–494.
39. Фомин А.С., Коваль О.А., Семенов Д.В., Потапенко М.О., Кулигина Е.В., Кит Ю.Я., Рихтер В.А. // *Биоорганическая химия*. 2012. Т. 38. № 1. С. 1–7.
40. Cetintas V.B., Batada N.N. // *J. Transl. Med.* 2020. V. 18. № 1. P. 45.
41. Smith J.S., Tachibana I., Passe S.M., Huntley B.K., Borell T.J., Iturria N., O’Fallon J.R., Schaefer P.L., Scheithauer B.W., James C.D., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2001. V. 93. № 16. P. 1246–1256.
42. Geue S., Aurbach K., Manke M.-C., Manukjan G., Münzer P., Stegner D., Brähler C., Walker-Allgaier B., Märklin M., Borst C.E., et al. // *Blood*. 2019. V. 134. № 21. P. 1847–1858.
43. Han J.E., Lim P.W., Na C.M., Choi Y.S., Lee J.Y., Kim Y., Park H.W., Moon H.E., Heo M.S., Park H.R., et al. // *Exp. Neurobiol.* 2017. V. 26. № 5. P. 295–306.
44. Velpula K.K., Tsung A.J. // *CNS Oncology*. 2014. V. 3. № 3. P. 177–179.

УДК 577.21; 579.23

# Новый ингибитор трансляции – производное имидазола

Д. А. Лукьянов<sup>1,6\*</sup>, В. С. Був<sup>2</sup>, Я. А. Иваненков<sup>3,4</sup>, В. Г. Карцев<sup>5</sup>, Д. А. Скворцов<sup>6,7</sup>,  
И. А. Остерман<sup>1,6,8</sup>, П. В. Сергиев<sup>1,2,6,9</sup>

<sup>1</sup>Сколковский институт наук и технологий, Центр наук о жизни, Сколково, 143028 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Институт биохимии и генетики РАН, Уфимский научный центр, Уфа, 450054 Россия

<sup>4</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт автоматики им. Н.Л. Духова, Москва, 127055 Россия

<sup>5</sup>InterBioScreen Ltd, Черноголовка, 142432 Россия

<sup>6</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

<sup>7</sup>Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, 101000 Россия

<sup>8</sup>Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, Сочи, 354340 Россия

<sup>9</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, Москва, 119991 Россия

\*E-mail: Dmitrii.Lukianov@skoltech.ru

Поступила в редакцию 18.12.2021

Принята к печати 10.03.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11654

**РЕФЕРАТ** Поиск новых антибиотиков и изучение механизма их действия представляют важную задачу. Одной из главных мишеней, на которые направлено действие антибиотиков в клетках бактерий, является рибосома. Даже если найденная молекула по тем или иным причинам не подходит для клинического применения, изучение механизма ее действия может углубить знания о работе рибосомы и послужить в дальнейшем базой для усовершенствования антибактериальных препаратов. В представленной статье рассмотрен новый ингибитор синтеза белка, исследование которого может быть полезным для модификации существующих ингибиторов синтеза белка. Нами показано, что 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид ингибирует синтез белка как *in vivo*, так и *in vitro*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** трансляция, бактерии, ингибитор трансляции, вещества с антибиотической активностью, производные имидазола.

## ВВЕДЕНИЕ

Пандемия коронавирусной инфекции подняла на новую высоту проблему уязвимости человеческой популяции для патогенных микроорганизмов. Не утешителен и прогноз распространения антибиотикорезистентности бактерий. Согласно данным Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), в 2015 году примерно 17% инфекционных заболеваний в странах, входящих в ОЭСР, вызваны резистентными к антибиотикам бактериями. В Российской Федерации число таких заболеваний превышает 40% [1]. По данным на 2016 год ежегодно от инфекций, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам, умирают порядка 700000 человек. Согласно прогнозу, опубликованному в 2016 году, к 2050 году смертность от инфекций,

вызванных устойчивыми формами бактерий, может вырасти до 10 млн человек [2]. Таким образом, перед современной наукой остро стоит задача поиска новых антибиотиков.

Синтез белка – жизненно важный процесс, в ходе которого генетическая информация, содержащаяся в мРНК, транслируется в аминокислотную последовательность белка, происходит на рибосомах. Бактериальная рибосома состоит из трех рибосомных РНК (16S, 23S, 5S) и более чем из 50 белков, образующих две субъединицы: малую 30S и большую 50S, которые, объединяясь, образуют 70S рибосому. Каждая из этих субъединиц, а также тоннель, через который выходит новосинтезированный пептид, служит мишенью для большого числа антибиотиков [3]. Так тетрациклин [4], стрептомицин [5], пакто-



мицин [6] и амикумадин А [6] связываются с малой субъединицей рибосомы. Определена структура комплекса с рибосомой для каждого из этих антибиотиков. Хлорамфеникол [7], клиндамицин [8] и бластицидин С [9] способны связываться с большой субъединицей рибосомы, что приводит к остановке синтеза белка. Антибиотики тетраценомицин Х [10], клебсазолицин [11] и эритромицин [7] блокируют выход пептида из рибосомы. Согласно опубликованным данным, более половины всех лекарственных средств, используемых при инфекционных заболеваниях, относятся к ингибиторам синтеза белка [12]. Поэтому понимание работы рибосомы может быть полезным как при поиске новых лекарственных средств, так и для улучшения уже известных. Нами описан новый ингибитор трансляции, понимание механизма действия которого может быть востребовано и фундаментальной наукой, и, после доработки, практическим здравоохранением.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Использование двойной репортерной системы для анализа механизма действия антибиотиков

Механизм действия антибиотиков изучали с использованием репортерной системы pDualrep2 [13]. Для проведения анализа ночную культуру клеток *Escherichia coli* JW5503 [14], замороженную в 50% глицерине, разбавляли в 10 раз в жидкой среде LB и высевали газоном на чашки Петри с 1.5% LB-агаром и ампициллином (50 мкг/мл). Чашки подсушивали, затем при помощи роботизированной станции Janus (Perkin Elmer, США) на их поверхность наносили по 96 образцов разных молекул (рис. 1). Перед нанесением молекулы растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, ООО «ФармаМед», Россия) до концентрации 20 мг/мл. Вносили по 30 мкг каждой молекулы. После нанесения чашки с клетками

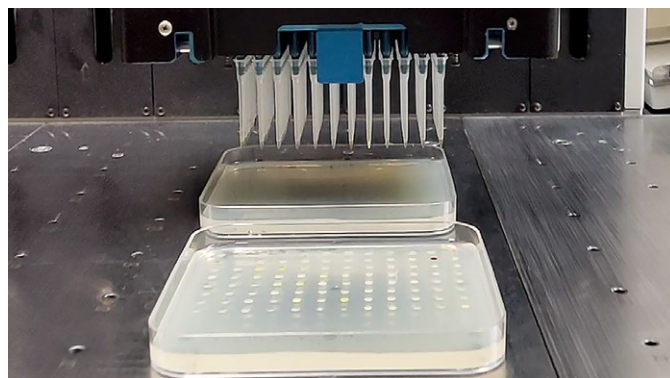


Рис. 1. Нанесение 96 индивидуальных молекул на чашки с клетками

инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C. Для визуализации результатов чашки сканировали при помощи ChemiDoc (Bio-Rad, США) в каналах Cy3 (для детекции TurboRFP) и Cy5 (для детекции Katushka2S).

### Измерение минимальной ингибирующей концентрации

Минимальную ингибирующую концентрацию измеряли в 96-луночных планшетах. Ряды планшета (1–11) заполняли суспензией клеток *E. coli* JW5503, полученной путем разбавления ночной культуры в 200 раз. В первый ряд добавляли 200 мкл клеток, в последующие по 100 мкл. Последний (12) ряд планшета заполняли питательной средой LB без клеток для контроля чистоты эксперимента.

В ячейки первого ряда добавляли 2 мкл тестируемого соединения (в концентрации 20 мг/мл), после чего готовили серию двукратных разведений в последующих рядах (до десятого). Для этого 100 мкл смеси восьмиканальной пипеткой переносили из первой ячейки во вторую, смешивали и повторяли процедуру до 10 ряда. В качестве контроля в один из рядов каждого планшета вместо исследуемого вещества добавляли 2 мкл эритромицина (5 мг/мл). После этого планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи с аэрацией при 200 об/мин. О концентрации клеток судили по величине оптической плотности ( $A_{600}$ ). Измерения проводили на планшетном ридере Victor X5 2030 (Perkin Elmer).

За минимальную ингибирующую концентрацию принимали наименьшую концентрацию исследуемого вещества, которая обеспечивала полное подавление роста бактерий.

### Тест на цитотоксичность

Цитотоксичность исследуемого вещества проверяли методом МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) [15] с некоторыми модификациями. 2500 клеток на лунку для клеточных линий MCF7, HEK293T и A549 или 4000 клеток на лунку для клеточной линии VA-13 высевали в 135 мкл среды DMEM-F12 (Gibco, США) в 96-луночный планшет и инкубировали в 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе в течение первых 16 ч без обработки. Затем к клеткам добавляли по 15 мкл смеси среды и DMSO раствора испытуемого вещества (конечные концентрации DMSO в средах составляли 1% или менее), обработка клеток велась в течение 72 ч 100 нг/мл – 200 мкг/мл (8 разведений), на каждое разведение было три повторности, в качестве контрольного вещества использовался доксорубин. Затем к клеткам добавляли МТТ (ООО «ПанЭко»,

Россия) до конечной концентрации 0.5 г/л (использовали 10-кратный маточный раствор в PBS) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем раствор МТТ сливали и добавляли 140 мкл DMSO (ООО «ФармаМед»). Планшеты встряхивали на шейкере (80 об/мин) для растворения формазана. Поглощение измеряли с помощью планшетного ридера Victor X5 2030 (Perkin Elmer) при длине волны 565 нм (для измерения концентрации формазана). Результаты использовали для построения графика доза–реакция и для оценки значения IC<sub>50</sub> (GraphPad Software, Inc., США).

### **In vitro** трансляция

Способность исследуемого вещества подавлять трансляцию определяли при помощи набора *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates (Promega, США).

Реакцию проводили в 5 мкл смеси следующего состава: 2 мкл S30 Premix, 1.5 мкл S30 клеточного экстракта *E. coli*, 0.5 мкл смеси аминокислот (каждая в концентрации 1 mM), 0.5 мкл мРНК (Fluc 200 нг/мкл), 0.2 mM *D*-люциферина, 0.1 мкл ингибитора РНКаз Ribolock и 0.5 мкл тестируемого соединения. Реакционную смесь (за исключением мРНК) предварительно смешивали на льду, далее инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, чтобы антибиотик успел связаться с рибосомой до сборки инициаторного комплекса, после чего смесь возвращали на лед и добавляли матрицу.

Трансляцию проводили в течение 20 мин при 37°C. Далее сигнал детектировали на планшетном ридере Victor X5 2030 (Perkin Elmer).

### **Тоупринт-анализ**

Тоупринт проводили по протоколу, описанному Орелле и соавт. [16].

На первом этапе праймеры метили [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ полинуклеотидкиназой (ThermoFisher, США) по протоколу производителя. Далее проводили *in vitro* трансляцию короткой модельной мРНК с использованием набора PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs, США). Реакционная смесь объемом 5 мкл содержала: 2 мкл раствора А, 1 мкл раствора В, 0.2 мкл Ribolock (ThermoFisher), 0.5 мкл исследуемого соединения, 0.5 мкл ДНК-матрицы (0.2 ммоль/мкл), 0.5 мкл радиоактивно меченного праймера. Смесь инкубировали в течение 20 мин при 37°C, затем добавляли 1 мкл смеси для обратной транскрипции из набора Titan One Tube RT-PCR System (Roche, Швейцария). Обратную транскрипцию проводили в течение 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 10 М NaOH с по-

следующей инкубацией в течение 15 мин при 37°C. Нейтрализацию проводили, добавляя 1 мкл 10 н. HCl. Затем добавляли 200 мкл буфера для ресуспендирования.

Полученные образцы очищали с помощью набора QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Германия).

Для приготовления секвенирующих смесей использовали набор USB® Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Affymetrix, США) согласно инструкции производителя.

Электрофорез проводили в 6% полиакриламидном геле (60 × 40 × 0.03 см), содержащем 19% акриламида, 1% N,N'-метиленбисакриламида и 7 М мочевины, в TBE-буфере в течение 2–3 ч. Образцы и продукты секвенирующих реакций наносили на гель по 2 и 1.5 мкл соответственно.

Гель переносили на 3-мм бумагу, просушивали и экспонировали в течение 18 ч с сенсорным экраном. Экран сканировали на приборе Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager (GE Healthcare, США).

Матрицу RST1 для данного эксперимента получали при помощи ПЦР-амплификации с использованием набора Taq-ДНК-полимеразы (ThermoFisher) по стандартному протоколу. Последовательность матрицы: АСТААТАСГАСТ-САСТАТАGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAA-CATATGTATTTGGTAACCTCACGTCAGCCGAA-TATGCTGAAAATCCATGGCTTCGAAGACTGC-GCСТААТААТААААААААAGTGATAGAATT-СТАТCGTTAATAAGCAAAATTCATTATAAC. Использовали прямой праймер – GTAА-ААСGАСGGССAGT; обратный праймер – СAGGAAACAGСТАTGАС, праймер для обратной транскрипции – GGTТААТGAA-ТТТTGСТТАТТААС.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Высокопроизводительный поиск веществ, проявляющих антибиотическую активность**

Для поиска веществ, проявляющих антибиотическую активность, использовали штамм *E. coli* JW5503 с делецией гена *tolC* [14], трансформированный плазмидой pDualrep2 [13] (рис. 2А). Ген *tolC* отвечает за синтез компонента AcrAB-TolC эффлюкс-системы и его отсутствие делает клетки более чувствительными к тестируемым веществам [17]. Репортерная система работает по следующему принципу: если соединение ингибирует синтез белка в клетке, то это приводит к остановке рибосом на модифицированной последовательности триптофанового оперона (*trpL*-2-Ala), что вызывает синтез дальнекрасного флуоресцентного белка Katushka2S (показано красным псевдоцветом на рис. 2Б). ДНК-

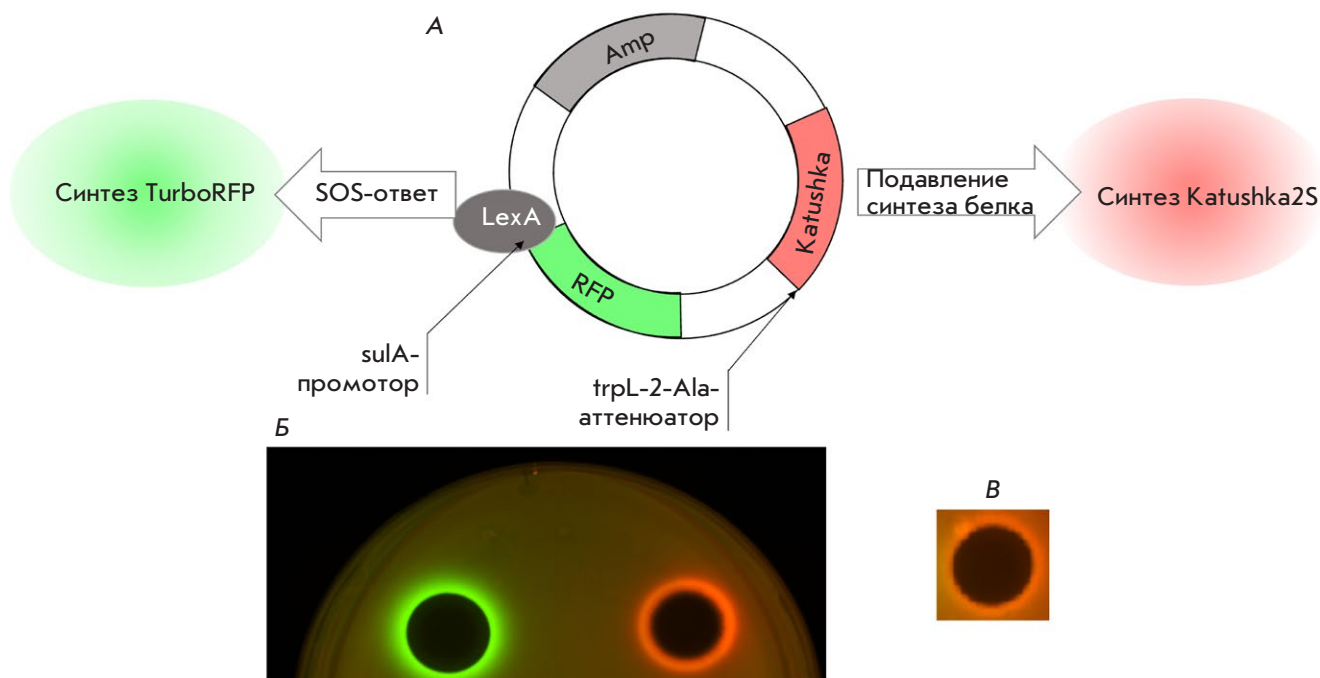


Рис. 2. А – строение репортерной плазмиды pDualrep2. Б – индукция двойной репортерной системы, чувствительной к ингибиторам трансляции или веществам, повреждающим ДНК. Капли эритромицина (справа, 2 мкг), левофлоксацина (слева, 0.05 мкг) наносили на поверхность чашки с агаром, содержащей клетки *E. coli* JW5503, трансформированные плазмидой pDualrep2. Экспрессия Katushka2S (красный) запускается ингибиторами трансляции, а экспрессия TurboRFP (зеленый) индуцируется при повреждении ДНК. В – индукция двойной репортерной системы молекулой 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлоридом (30 мкг)

повреждающие соединения активируют SOS-ответ в клетке, что приводит к диссоциации белка-репрессора LexA с промотора *sulA* и запуску экспрессии гена красного флуоресцентного белка TurboRFP (рис. 2Б, показано зеленым псевдоцветом).

В ходе высокопроизводительного поиска в библиотеках химических соединений, предоставленных компанией InterBioScreen Ltd, среди веществ, проявляющих антибиотическую активность, найдена молекула, не только подавляющая рост штамма *E. coli* JW5503, трансформированного плазмидой pDualrep2, но и индуцирующая экспрессию гена *Katushka2S*, свойственную трансляционным ингибиторам (рис. 2В). Формула данной молекулы – 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида, представлена на рис. 3А (STOCK4S-33513). При этом в ходе поиска были проверены два аналога данной молекулы 1-(2-((2,5-диметоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-37310). При этом в ходе поиска были проверены два аналога данной молекулы 1-(2-((2,5-диметоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-72264)

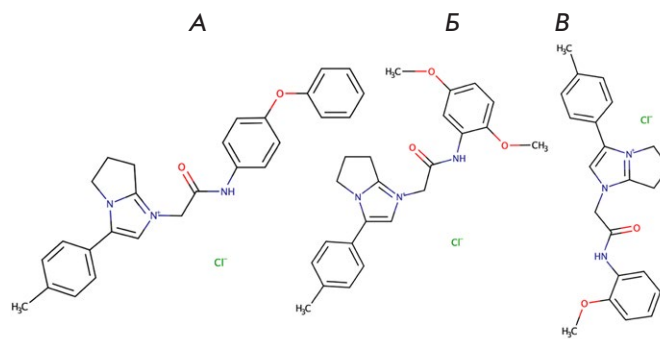


Рис. 3. А – структурная формула активной молекулы 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513). Б – структурная формула аналога активной молекулы 1-(2-((2,5-диметоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-37310). В – структурная формула аналога активной молекулы 1-(2-((2-метоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5H-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-72264)

имидазол-1-ий хлорид (STOCK4S-37310, рис. 3Б) и 1-(2-((2-метоксифенил)амино)-2-оксоэтил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид (STOCK4S-72264, рис. 3В). Эти молекулы не давали зон ингибирования роста штамма *E. coli* JW5503, трансформированного плазмидой pDualrep2, в тесте на твердой агаризованной среде, поэтому дальнейшие эксперименты проводили только с использованием молекулы 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид.

В тесте на штамме *E. coli* BW25113, трансформированном репортерной плазмидой, данная молекула активности не проявила.

### Измерение минимальной ингибирующей концентрации

Минимальную ингибирующую концентрацию определяли методом последовательных разведений на штамме *E. coli* JW5503 с делецией гена *tolC* [14]. Минимальная ингибирующая концентрация 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида равна 3.1 мкг/мл. Это сопоставимо с ингибирующей концентрацией такого природного ингибитора синтеза белка, как эритромицин, минимальная ингибирующая концентрация которого на данном штамме составила 3.1 мкг/мл.

### Измерение цитотоксичности на эукариотических клетках

Токсичность данного соединения была проверена на нескольких культурах клеток человека в МТТ-тесте. К сожалению, для клеток человека это соединение оказалось более токсичным, чем для бактериальных клеток, что делает его непригодным (в данной форме) для использования в качестве лекарственного средства. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1. Данные МТТ-теста для 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида

Клеточная линия	Концентрация*, мкг/мл
HEK293T	0.2 ± 0.1
MCF7	1.8 ± 0.5
A549	0.5 ± 0.1
VA-13	0.4 ± 0.2

\*Концентрация, в которой исследуемая молекула токсична для клеток, мкг/мл.

### Трансляция в бесклеточной системе

Реакцию трансляции в бесклеточной системе проводили с использованием набора *E. coli* S30 Extract System for Linear Templates от компании Promega. Синтез люциферазы светлячка в данном эксперименте определяли, используя реакцию окисления люциферина в оксилуциферин. Если в реакционной смеси присутствует ингибитор трансляции, то люцифераза не синтезируется и люциферин не разлагается. Результаты каждого эксперимента нормировали по растворителю (диметилсульфоксиду), добавленному в том же объеме, что и раствор исследуемого вещества. Данные для 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513) приведены на рис. 4.

Исходя из полученных результатов можно констатировать, что молекула 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513) является ингибитором трансляции.

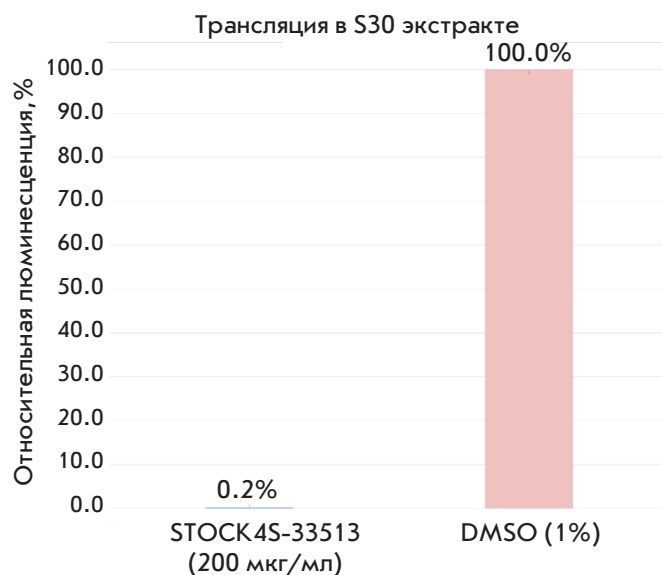


Рис. 4. Трансляция в бесклеточной системе на основе лизата *E. coli* (Promega) с добавлением 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513), взятого в концентрации 200 мкг/мл. За 100% взят сигнал от люциферазы, синтезированной в бесклеточной системе, без добавления ингибиторов трансляции



### Анализ места остановки рибосом

Метод тоупринт позволяет не только подтвердить, является ли соединение ингибитором синтеза белка или нет, но и дает возможность предположить, на каком именно этапе произошла остановка трансляции. Суть метода состоит в том, что в бесклеточной системе, основанной на индивидуально выделенных компонентах трансляции, в присутствии исследуемого вещества синтезируется короткий пептид. К реакционной смеси добавляется радиоактивно меченный праймер, комплементарный 3'-концевому участку мРНК, РНК-зависимая-ДНК-полимераза и 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты. После этого происходит удлинение праймера по матрице РНК до тех пор, пока РНК-зависимая-ДНК-полимераза не встретится с рибосомой или не дойдет до конца матрицы. Если в смесь добавлен ингибитор синтеза белка, то рибосома остановится на матрице и не позволит РНК-зависимой-ДНК-полимеразе дойти до конца матрицы и фрагмент кДНК будет коротким. Точную длину фрагмента кДНК и место остановки рибосомы на мРНК можно рассчитать, исходя из последовательности РНК и положения продукта обратной транскрипции в геле относительно продуктов секвенирования по Сэнгеру, разделяемых в соответствующих дорожках геля. В типичном эксперименте мы также сравниваем места остановки рибосомы новыми и известными ингибиторами трансляции. Расстояние между первым нуклеотидом Р-сайта заблокированной на мРНК рибосомы и последним синтезированным нуклеотидом кДНК составляет 16 н. Для сравнения удобно использовать антибиотик тиострептон, который, как известно, останавливает рибосому на первом шаге трансляции в тот момент, когда в Р-сайте рибосомы находится стартовый кодон AUG. Исходя из этих данных мы провели расчет кодонов, которые были в Р-сайте на момент остановки рибосомы (рис. 5). Этими кодонами оказались 1-AUG (M), 2-UAU (Y), 8-CAG (Q). Однако если посмотреть на контроль без добавления антибиотика DMSO, то можно увидеть те же небольшие остановки на тех же местах, но менее выраженные. Это позволяет выдвинуть гипотезу, согласно которой данный ингибитор трансляции может влиять на кинетику синтеза белка на участках мРНК, которые рибосома проходит с большим трудом.

### ВЫВОДЫ

В ходе работы исследован новый ингибитор бактериальной трансляции 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]имидазол-1-ий хлорид, найденный в химической библиотеке. Показано, что эта моле-

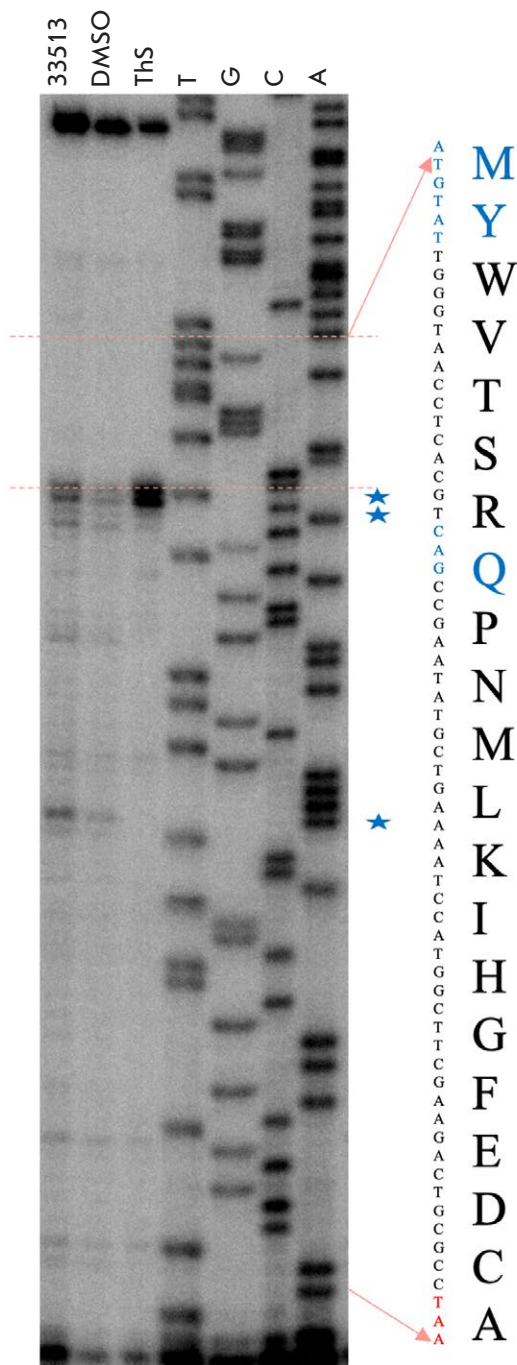


Рис. 5. Схема тоупринт-анализа на матрице RST1. 33513 – система трансляции с добавлением исследуемого вещества – 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-а]-имидазол-1-ий хлорида (STOCK4S-33513) в концентрации 200 мкг/мл. DMSO – отрицательный контроль (DMSO 1%); ThS – в систему трансляции добавлен контрольный антибиотик тиострептон в концентрации 50 мкМ (останавливает трансляцию на старт-кодоне [18]), T, G, A, C – секвенирующие реакции с последовательными остановками на соответствующих нуклеотидах

кула индуцирует репортерную систему и выступает как ингибитор трансляции *in vivo*. Установлено, что данная молекула может ингибировать трансляцию *in vitro*, а также усиливает остановку рибосомы в ходе синтеза небольших пептидов. Несмотря на то что это соединение не может использоваться в качестве лекарственного средства, поскольку проявляет высокую токсичность в отношении клеток

человека, более детальное исследование данной молекулы может дать более полное понимание функционирования такой важной молекулярной машины, как рибосома. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 20-34-90048.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stemming the Superbug Tide. Paris: OECD Publishing, 2018. 224 p.
2. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally. L.: Government of the United Kingdom, 2016. 84 p.
3. Ramakrishnan V. // *Cell*. 2002. V. 108. № 4. P. 557–572.
4. Jenner L., Starosta A.L., Terry D.S., Mikolajka A., Filonava L., Yusupov M., Blanchard S.C., Wilson D.N., Yusupova G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 10. P. 3812–3816.
5. Demirci H., Murphy F., Murphy E., Gregory S.T., Dahlberg A.E., Jogle G. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1355.
6. Polikanov Y.S., Osterman I.A., Szal T., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Kusocheck P., Bulkley D., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V., et al. // *Mol. Cell*. 2014. V. 56. № 4. P. 531–540.
7. Bulkley D., Innis C.A., Blaha G., Steitz T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 40. P. 17158–17163.
8. Dunkle J.A., Xiong L., Mankin A.S., Cate J.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 40. P. 17152–17157.
9. Svidritskiy E., Ling C., Ermolenko D.N., Korostelev A.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 30. P. 12283–12288.
10. Osterman I.A., Wieland M., Maviza T.P., Lashkevich K.A., Lukianov D.A., Komarova E.S., Zakalyukina Y.V., Buschauer R., Shiriaev D.I., Leyn S.A., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 16. № 10. P. 1071–1077.
11. Metelev M., Osterman I.A., Ghilarov D., Khabibullina N.F., Yakimov A., Shabalin K., Utkina I., Travin D.Y., Komarova E.S., Serebryakova M., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. № 10. P. 1129–1136.
12. Lin J., Zhou D., Steitz T.A., Polikanov Y.S., Gagnon M.G. // *Annu. Rev. Biochem.* 2018. V. 87. P. 451–478.
13. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryaev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
14. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // *Mol. Syst. Biol.* 2006. V. 2. P. 2006.0008.
15. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods*. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
16. Orelle C., Szal T., Klepacki D., Shaw K.J., Vázquez-Laslop N., Mankin A.S. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 14. P. e144.
17. Li X.Z., Plésiat P., Nikaido H. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2015. V. 28. № 2. P. 337–418.
18. Orelle C., Carlson S., Kaushal B., Almutairi M.M., Liu H., Ochabowicz A., Quan S., Pham V.C., Squires C.L., Murphy B.T., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 12. P. 5994–6004.

УДК 576.32/.36

# Ras участвует в регуляции стабильности аденовирусного белка E1A через MAP-киназу ERK

А. В. Моршнева\*, О. О. Гнедина, Д. Н. Киндт, М. В. Игotti

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*E-mail: 1195alisa@gmail.com

Поступила в редакцию 30.12.2021

Принята к печати 18.03.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11675

**РЕФЕРАТ** Аденовирусный белок E1A, необходимый для реализации жизненного цикла вируса, активно изучается в связи с его возможным применением в качестве сенсibiliзирующего агента в комбинированной терапии рака, в частности опухолей с активированным Ras. Мы изучили роль сигнального пути Ras в регуляции стабильности E1A и показали, что при сверхэкспрессии активированного Ras в E1A-экспрессирующих клетках увеличивается содержание E1A и при этом усиливается его деградация при действии ингибиторов гистоновых деацетилаз (ИГД). Установлено, что ключевым фактором стабилизации E1A является MAP-киназа ERK, которая инактивируется при действии ИГД, что приводит к деградации белка E1A. Полученные результаты указывают на то, что возможности применения аденовирусного E1A и ингибиторов деацетилаз гистонов в комбинированной терапии опухолей с активированным Ras ограничены ввиду интенсивной ИГД-зависимой деградации E1A. Тем не менее участие MAP-киназы ERK в регуляции стабильности E1A может быть использовано для подбора эффективных комбинаций препаратов на основе аденовирусного белка E1A.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** молекулярная онкология, Ras, E1A, комбинированная терапия, ингибиторы деацетилаз гистонов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИГД – ингибиторы гистоновых деацетилаз; E1A – белок, кодируемый ранним геном 1A аденовируса; LC – лактацистин (ингибитор протеасом); WM – вортманнин (ингибитор PI3K); NaBut – бутират натрия; Ac-Lys – ацетилированный лизин.

## ВВЕДЕНИЕ

Ранний ген E1A аденовируса человека типа 5 (Ad5) первым экспрессируется при аденовирусной инфекции и является критическим регулятором вирусной репликации. Белок E1A запускает экспрессию других генов Ad и создает условия, необходимые для его репликации, а именно, стимулирует переход инфицированной клетки в фазу синтеза ДНК – фазу S клеточного цикла [1]. E1A не способен непосредственно взаимодействовать с ДНК, но, будучи кофактором, он изменяет активность многих транскрипционных факторов и коактиваторов, среди которых белок ретинобластомы Rb, ингибитор циклинзависимых киназ p21/Waf, ацетилтрансферазы СВР/p300, ATF, AP1, Sp1 и др. [2].

Несмотря на вирусную природу E1A, научный интерес к этому гену и его функциям выходит далеко за пределы вирусологии. Благодаря стимуляции перехода инфицированной клетки в S-фазу клеточного цикла и подавлению репликативного старения [3], белок E1A обладает иммортализирующей активностью. При экспрессии в первичных клетках грызунов E1A

способствует онкогенной трансформации в сочетании с активированным *ras* [4] или другими комплементирующими онкогенами, например, другим геном раннего региона Ad5 E1B [5]. Однако в клетках человека E1A не является онкогенным [6, 7].

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют об онкосупрессорных свойствах E1A в различных типах опухолевых клеток человека: карциноме, фибросаркоме и меланоме, что удивительно, принимая во внимание разнообразие генетических изменений в этих трех типах опухолей. Показано несколько механизмов опосредованного E1A подавления опухолевого роста, среди которых снижение метастатического потенциала, а также индукция апоптоза [8, 9].

Более поздние исследования показали, что экспрессия аденовирусного E1A повышает чувствительность раковых клеток к действию ряда цитотоксических агентов, используемых в противоопухолевой терапии, таких, как этопозид, цисплатин, таксаны и др. [10, 11]. При этом наблюдается селективная сенсibiliзирующая активность аденовирусного E1A

по отношению к раковым, но не нормальным клеткам [12, 13]. В связи с этим аденовирусный E1A рассматривается как перспективный сенсibiliзирующий компонент комбинированной терапии опухолей.

Объектом нашего интереса является изучение возможности использования E1A в комбинированной химиотерапии – в сочетании с ингибиторами гистоновых деацетилаз (ИГД). Действие ИГД направлено на повышение уровня ацетилирования гистонов – эпигенетической модификации, обеспечивающей регуляцию таких фундаментальных клеточных процессов, как экспрессия генов, репликация ДНК, стабильность генома [14]. Показано, что сенсibiliзирующий эффект E1A в отношении цитотоксического действия ИГД (SANA, TSA) сильнее, чем других химиотерапевтических препаратов (5-фторурацил, цисплатин, эпопозид, паклитаксел) [13]. Однако, как показано нами ранее, действие ИГД приводит к деградации E1A [15].

В качестве ИГД мы выбрали бутират натрия – ИГД широкого спектра, ингибирующий все деацетилазы гистонов, за исключением деацетилаз 6 и 10 второго класса и деацетилаз третьего класса [16]. Бутират натрия – метаболит, образующийся в организме млекопитающих [17], поэтому он обладает низкой цитотоксичностью в отношении нормальных клеток и избирательно убивает раковые клетки [18].

Белок E1A, как и продукты других онкогенов, имеет довольно короткое время полужизни, равное примерно 40 мин [19]. Внутриклеточный уровень регуляторных белков с коротким временем полужизни, таких, как циклины, p53, бета-катенин, p27kip и Мус, контролируется убиквитин-протеасомной системой. В связи с этим такой путь деградации предположительно реализуется и для белка E1A. Тем не менее точный механизм регуляции стабильности белка E1A все еще не установлен. Показано, что деградация белка E1A запускается не через убиквитинирование, а через фосфорилирование его С-концевых аминокислотных остатков [20]. Примечательно, что сам белок E1A действует как протеасомный регулятор, способный как подавлять убиквитин-протеасомную систему путем прямого связывания его N-концевого участка с 26S субъединицей протеасомы [20], так и стимулировать убиквитинирование отдельных белков [21].

Ранее нами были отмечены различия в интенсивности ИГД-индуцированной деградации белка E1A в клетках, экспрессирующих Ras дикого типа или мутантный белок, что дало нам возможность выдвинуть предположение о роли белка Ras в регуляции стабильности E1A [15]. Малая GTP-аза Ras является ключевым регулятором клеточного роста [22]. В норме она активируется в ответ на вне-

клеточные стимулы и запускает программы пролиферации, однако при патологиях, приводящих к активации Ras-сигналинга, белок Ras постоянно находится в активированном состоянии, что приводит к независимому от сигналов внешней среды делению клеток и индукции канцерогенеза [23]. Конститутивная активность белка Ras, обусловленная мутациями в кодирующем его гене, выявлена в целом ряде опухолей, включая такие агрессивные и трудно поддающиеся лечению формы, как меланома, колоректальный рак и рак легкого [24], поэтому изучение опухолей с мутациями Ras имеет большое значение для разработки методов их терапии.

Наша работа посвящена изучению вклада активированного Ras в стабильность E1A при воздействии ИГД, что необходимо для рассмотрения возможности применения комплексной терапии с использованием ИГД и аденовирусного E1A, направленной на усиление антипролиферативного эффекта в опухолевых клетках с активированным Ras.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии

Линия E1A+Ras получена трансформацией эмбриональных фибробластов мыши комплементирующими онкогенами – раннего гена E1A аденовируса человека типа 5 (Ad5) и сНа-ras, несущим активирующие мутации в кодонах 12 и 61 [25]. Линия E1A+E1B получена трансформацией эмбриональных фибробластов крысы HindIII-районом Ad5, кодирующим белки E1A и E1B. Клетки эмбриональной почки человека, трансформированные аденовирусом типа 5 (HEK293), получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных».

Клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM с 10% FCS. Клетки обрабатывали 4 мМ бутиратом натрия (Calbiochem, США) и/или 1–2 мкМ лактацистинном (Calbiochem).

### ОТ-ПЦР

РНК выделяли из клеток с использованием реактива Trizol (Invitrogen, США). Обратную транскрипцию проводили с 2 мкг РНК и 1 мкг случайных гексапраймеров. Реакцию ПЦР проводили с использованием ПЦР-циклера Eppendorf Mastercycler personal (AG 22331) в присутствии 100 нг праймеров к кДНК интересующих генов (E1A: 5'-CTTTCCACCCAGTGACGACG-3'/5'-TGTCGGCGTCTCAGGATAG-3'; gapdh: 5'-TCATCAGCAATGCCTCCTGCACC-3'/5'-ACAGTTTCCCGAGGGGCGCA-3') в течение 22–32 циклов, включающих денатурацию в течение 30 с (95°C), отжиг праймеров 30 с (61°C E1A, 58°C gapdh) и элонгацию – 1 мин (72°C).



### Фракционирование клеточных экстрактов

Клетки суспендировали в 10 мМ HEPES-КОН (рН 7.9), после чего добавляли 0.4% NP-40 и центрифугировали при 5000 об/мин для получения цитоплазматических экстрактов. Осадки лизировали в 20 мМ HEPES-КОН (рН 7.9) и затем центрифугировали при 15000 об/мин для получения ядерных экстрактов.

### Иммунопреципитация и иммуноблотинг

Клетки лизировали в буфере, содержащем 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, ингибиторы протеаз и фосфатаз (для иммунопреципитации использовали буфер, содержащий 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия SDS). Белки разделяли в 10–12% полиакриламидном геле, переносили на мембрану PVDF (Millipore, США) и анализировали с помощью специфических антител, выявляя методом усиления хемилюминесценции (ECL, Amersham Biosciences, Великобритания) и визуализировали на Syngene PXi6 Access. Использовали антитела к белкам E1A sc-25 G1713 1 : 1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), pan-Ras OP40 1 : 1000 (Calbiochem), pERK1/2 #4377 1 : 800 (Cell Signalling, США), pAkt (Ser 473) #4060 1 : 1000 (Cell Signalling), p-p38 #9211 1 : 1000 (Cell Signalling), p-JNK #9251 1:500 (Cell Signalling), ацетилированного лизина #9441 1:500 (Cell Signalling),  $\alpha$ -тубулина sc-32293 1 : 10000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) и Gapdh 2118 1 : 1000 (Cell Signalling). Каждый белок был проанализирован не менее чем в трех повторностях. Для денситометрического анализа использовали программу ImageJ. Значения нормированы на контроль нагрузки (Gapdh) и приведены к относительным единицам измерения. На графиках приведены средние значения 3–5 экспериментов, планки погрешности – стандартная ошибка среднего (SEM).

### Временная трансфекция

Для трансфекции клетки высевали на 12-луночную плату (среда DMEM с 10% FCS без антибиотика) в плотности  $150 \times 10^3$  клеток на ячейку. Трансфекцию векторов pcDNA3 (Addgene) и pSV2-ras, кодирующего сHa-ras (Addgene) проводили с помощью Lipofectamine-2000 (Invitrogen) по протоколу производителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Динамика деградации белка E1A при действии ИГД бутирата натрия в клетках с различным статусом Ras

Для изучения влияния Ras-сигнального пути на стабильность E1A были использованы две экспрессирующие E1A линии трансформированных клеток, от-

личающиеся статусом активности белка Ras: линия E1A+Ras, экспрессирующая активированный сHa-ras, и линия E1A+E1B, экспрессирующая *ras* дикого типа.

Данные ОТ-ПЦР и иммуноблотинга показывают, что бутират натрия (NaBut) не влияет на транскрипцию гена *E1A* (рис. 1А), тогда как белковый продукт подвергается деградации в обеих клеточных линиях, но с различной динамикой и интенсивностью (рис. 1Б). В клетках E1A+Ras белок E1A деградирует быстро, тогда как в клетках линии E1A+E1B он продолжает выявляться даже спустя 72 ч действия NaBut. Схожая динамика умеренного снижения количества E1A наблюдается и в клетках HEK293, экспрессирующих ген *ras* дикого типа (рис. 1В).

### Экспрессия активированного Ras увеличивает содержание белка E1A, однако приводит к его дестабилизации при действии бутирата натрия

Для подтверждения вовлеченности активированного Ras в регуляцию стабильности белка E1A экспрессионный вектор, кодирующий сHa-Ras с активирующими мутациями, был введен в клетки HEK293. Активированное состояние экзогенного Ras подтверждается данными иммуноблотинга о накоплении фосфорилированной формы киназы ERK,

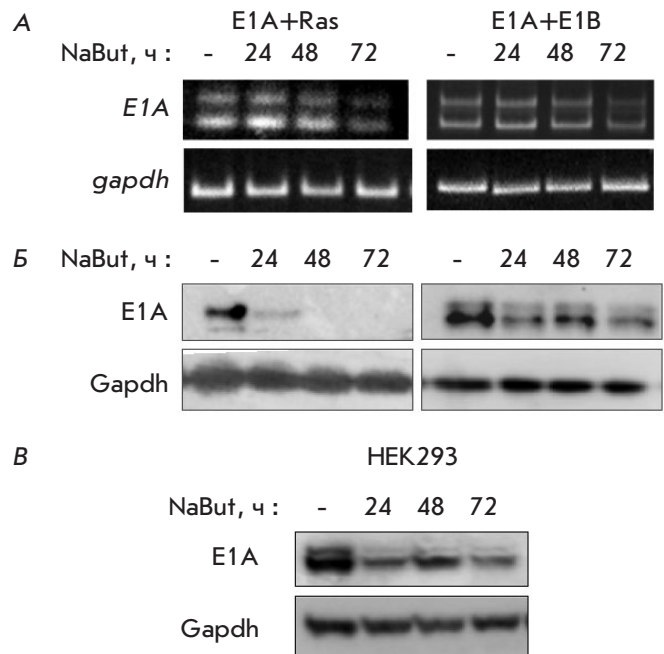
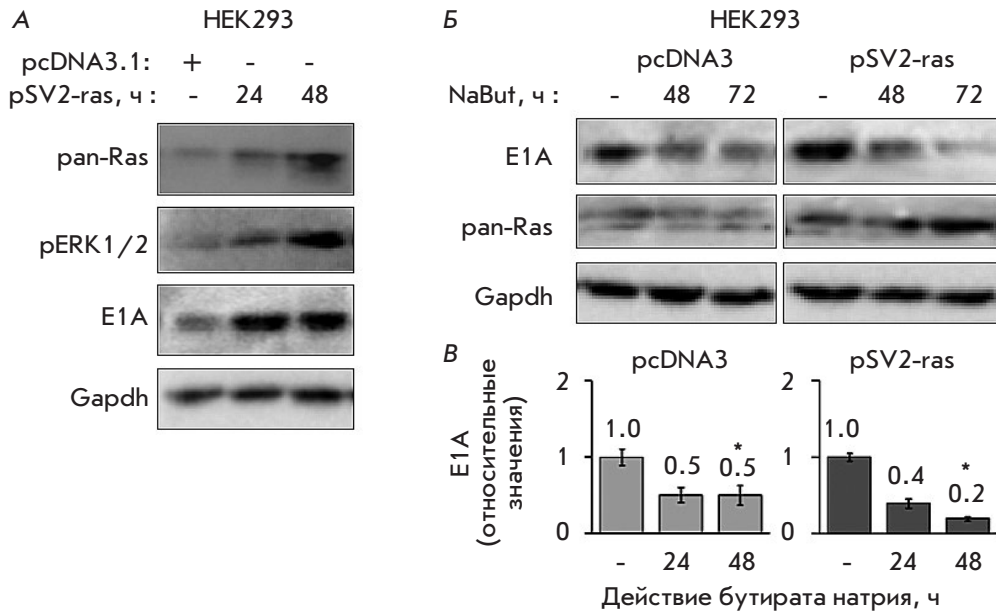


Рис. 1. NaBut вызывает деградацию белка E1A, наиболее выраженную в клетках с активированным Ras. А – анализ транскрипции *E1A* методом ОТ-ПЦР. Изменение количества белкового продукта E1A методом иммуноблотинга в E1A-экспрессирующих клетках грызунов (Б) и человека (В). Ген *gapdh* и его белковый продукт использованы в качестве контроля нагрузки в ОТ-ПЦР и иммуноблотинге соответственно



**Рис. 2.** Активированный Ras стабилизирует E1A, однако усиливает его деградацию при действии NaBut. Иммуноблотинг белков из клеток HEK293: трансфицированных векторами pcDNA3 (контрольный вектор) или pSV2-ras, с антителами против E1A, pERK и pan-Ras (A); и трансфицированных векторами pcDNA3 (контрольный вектор) или pSV2-ras, и обработанных 4 мМ NaBut в течение 0–72 ч, с антителами к E1A и pan-Ras (Б). Gapdh использован в качестве контроля нагрузки. В – гистограммы усредненного количества E1A в трансфицированных клетках HEK293 при действии NaBut, полученные денситометрическим анализом данных иммуноблотинга с нормированием на контроль нагрузки (Gapdh); количество E1A в необработанных клетках принято за единицу. Планки погрешности построены по значениям стандартной ошибки среднего (SEM). Для проверки значимости различий использовали тест Манна–Уитни, сравнивая попарно значения каждой временной точки для двух векторов (\* $p < 0.05$ )

нижележащей MAP-киназы, после трансфекции клеток мутантным сHa-ras (рис. 2А). Экспрессия активированного Ras сопровождается накоплением аденовирусного белка E1A (рис. 2А). Таким образом, наши результаты показывают стабилизирующее влияние активированного Ras-сигналинга на белок E1A аденовируса.

При действии NaBut в клетках, трансфицированных вектором, кодирующим активированный Ras (pSV2-ras), деградация белка E1A происходит быстрее, чем в клетках, трансфицированных контрольным вектором pcDNA3 (рис. 2Б,В). Таким образом, сверхэкспрессия активированного Ras приводит к накоплению белка E1A, однако делает E1A более чувствительным к действию NaBut, усиливая его деградацию.

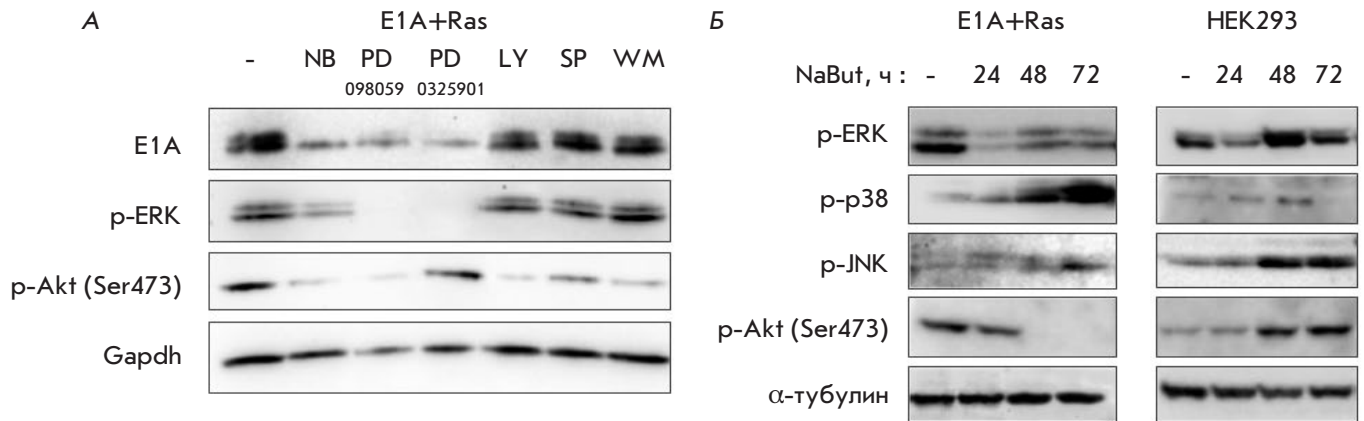
Механизмы, вовлеченные в Ras-зависимую стабилизацию белка E1A, выявляли с использованием ингибиторов нижележащих киназ в Ras-зависимых сигнальных каскадах. С помощью иммуноблотинга показано, что подавление только активности киназы ERK фармакологическими ингибиторами PD098059 или PD0325901 приводит к снижению количества E1A в клетках E1A+Ras (рис. 3А).

С целью изучения механизмов ИГД-индуцированной деградации E1A сравнили изменения актив-

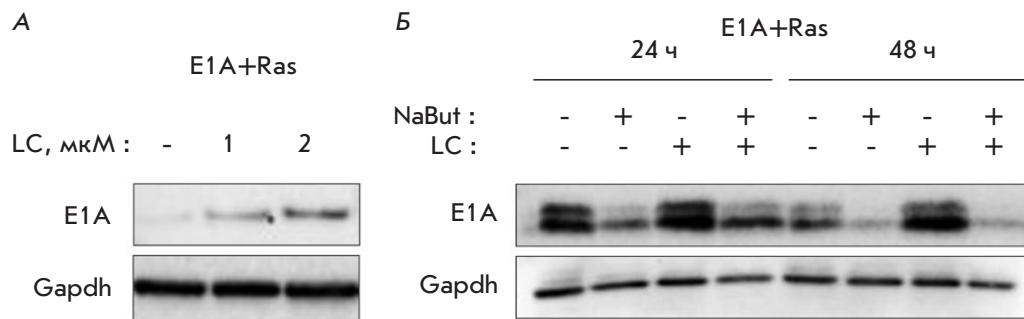
ности различных Ras-зависимых киназ при действии NaBut в клетках с различным статусом Ras. По данным иммуноблотинга с использованием фосфоспецифических антител NaBut сходным образом изменяет активность киназ p38 и JNK в клетках с нормальным и активированным Ras (рис. 3Б). Выявлены принципиальные различия в изменении активности киназ ERK и PKB/Akt. Так, в клетках E1A+Ras с активированным Ras NaBut вызывает падение активности киназ ERK и PKB/Akt, тогда как в клетках HEK293, экспрессирующих нормальный Ras, активность этих киназ увеличивается (рис. 3Б), что подразумевает вовлеченность этих киназ в регулирование как базального уровня белка E1A, так и изменения его количества при воздействии NaBut.

### Ингибирование протеасом не отменяет индуцированное бутиратом натрия снижение количества E1A

Для выявления роли убиквитин-протеасомной системы в ИГД-зависимом снижении количества E1A клетки E1A+Ras обрабатывали ингибитором протеасом лактацистином (LC). Обработка LC сопровождается дозозависимым увеличением количества белка E1A (рис. 4А).



**Рис. 3.** Киназы Akt и ERK как факторы стабилизации E1A в Ras-экспрессирующих клетках. **А** – изменение количества белка E1A в E1A-экспрессирующих клетках с активированным Ras при обработке 4 мМ NaBut и ингибиторами Ras-зависимых киназ (50 мкМ PD098059 и PD0325901 – ингибиторы ERK, 20 мкМ LY и 10 мкМ WM – ингибиторы PI3K, 10 мкМ SP – ингибитор JNK) в течение 24 ч. **Б** – динамика фосфорилирования киназ при действии NaBut в клетках с активированным и нормальным Ras. Иммуноблотинг белков из клеток E1A+Ras и HEK293, необработанных или обработанных 4 мМ NaBut в течение 0–48 ч. Gapdh/α-тубулин использован в качестве контроля нагрузки



**Рис. 4.** Иммуноблотинг белков клеток E1A+Ras, обработанных ингибитором протеасом лактацистином (1 мкМ и 2 мкМ LC) (**А**) или совместно обработанных в течение 24–48 ч NaBut и/или 2 мкМ LC, с антителами против E1A (**Б**). Gapdh использован в качестве контроля нагрузки

Для проверки возможности предотвращения NaBut-индуцированной деградации E1A при подавлении активности протеасом клетки E1A+Ras обрабатывали NaBut или NaBut в сочетании с LC в течение 24–48 ч. Методом иммуноблотинга показано, что через 24 ч LC оказывает легкий стабилизирующий эффект как на контрольные, так и на обработанные NaBut клетки, однако при более продолжительном действии агентов количество белка E1A падает независимо от присутствия LC (*рис. 4Б*).

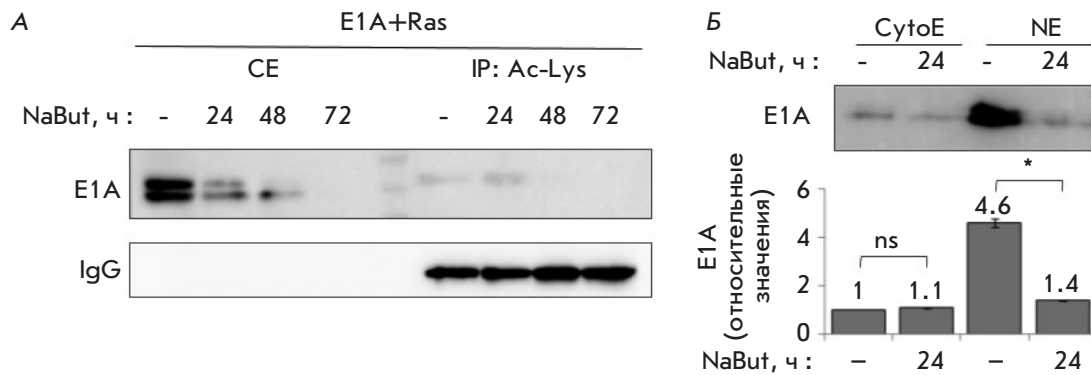
Таким образом, нами показано, что LC повышает базальный уровень белка E1A, но не предотвращает его деградацию при длительном действии NaBut.

Как известно, для деградации белка необходима его локализация в цитоплазме. Ранее было показано, что на релокализацию E1A может влиять его ацетилирование [26]. В связи с этим изучено влияние NaBut на степень ацетилированности E1A и его внутриклеточную локализацию. По данным иммуноблотинга, проведенного после иммунопреципитации с антителами к ацетилированному лизину, в первые

24 ч NaBut вызывает накопление ацетилированного E1A в клетках E1A+Ras, однако затем белок E1A перестает выявляться (*рис. 5А*). При этом данные иммуноблотинга фракционированных клеточных экстрактов свидетельствуют о том, что белок E1A, имеющий преимущественно ядерную локализацию, выходит из ядра при действии NaBut (*рис. 5Б*). Это позволяет предположить, что NaBut способствует усилению ацетилирования белка E1A, что влечет за собой его релокализацию из ядра в цитоплазму, где он подвергается быстрой деградации.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Способность ИГД вызывать деградацию аденовирусного белка неоднократно показана экспериментально [13, 26–28], однако механизмы регуляции этого процесса, а также факторы стабилизации E1A до сих пор не установлены. Ранее мы показали, что такие ИГД, как бутират натрия, трихостатин А и вориностат (SAHA), вызывают деградацию аденовирусного белка E1A, при этом динамика ИГД-



**Рис. 5.** Ацетилирование и релокализация E1A при действии NaBut. **А** – иммунопреципитация с антителами против ацетилированного лизина (IP: Ac-Lys) с последующим иммуноблотингом с антителами к E1A. Иммуноглобулины G (IgG) использованы в качестве контроля нагрузки. **Б** – иммуноблотинг фракционированных клеточных экстрактов (CytoE – цитоплазматические экстракты, NE – ядерные экстракты) с антителами к E1A. Экстракты получены из клеток, необработанных или обработанных 4 мМ NaBut в течение 24 ч. Гистограмма отображает усредненное количество E1A, полученное денситометрическим анализом данных иммуноблотинга с нормированием на интенсивность сигнала загрузки дорожки (Ponceau S); количество E1A в необработанном NaBut цитоплазматическом экстракте принято за единицу. Планки погрешности построены по значениям стандартной ошибки среднего (SEM). Для проверки значимости различий использовали тест Манна–Уитни (ns  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ )

индуцированного снижения уровня E1A коррелирует с активностью белка Ras в клетках [29].

В представленной работе нами изучен эффект участников Ras-сигналинга на стабильность аденовирусного E1A. Впервые мы показали, что сверхэкспрессия активированного Ras приводит к накоплению белка E1A. Согласно нашим данным, в Ras-зависимой стабилизации E1A определяющую роль играют киназы ERK1/2. Так, накопление аденовирусного белка E1A, индуцированное сверхэкспрессией активированного Ras, сопровождается активацией ERK1/2 (рис. 2А), а подавление активности пути MEK/ERK фармакологическими ингибиторами вызывает снижение количества E1A (рис. 3Б).

Индукцированная ИГД деградация E1A опосредована также активностью киназы ERK. Уменьшение количества белка E1A, вызванное действием NaBut, сопровождается инактивацией киназы ERK (рис. 3А). В подвергнутых действию NaBut клетках с активированным Ras выявлена также отрицательная динамика киназы Akt, однако ее инактивация не влияет на содержание E1A, как показано в опытах с использованием специфических ингибиторов Akt (рис. 3А).

Участие Ras-сигналинга в регуляции аденовирусного белка не случайно, так как при инфекции вирусы индуцируют передачу сигналов через MAP-киназный каскад [30] и, в частности, через киназу ERK [31]. Известно, что аденовирус усиливает активность ERK как на ранней, так и на поздней фазе инфекции [32].

Понимание взаимодействия вируса с компонентами Ras-сигнального пути клетки может быть определяющим для конструирования онколитических вирусов, специфически реплицирующихся в ра-

ковых клетках, а также для разработки подходов к противоопухолевой терапии с использованием аденовирусных белков.

Фосфорилирование по остаткам серина играет важную роль в регуляции активности белка E1A, в частности, фосфорилирование Ser185 и Ser188 активированной киназой ERK1/2 увеличивает экспрессию генов с промотора E4 [33]. Возможность участия фосфорилирования в стабилизации белка E1A пока недостаточно изучена. До сих пор только в двух работах показано, что как функции, так и содержание белка E1A находятся в сильной зависимости от киназного каскада MEK/ERK [32, 33], при этом предполагается, что изменение активности сигнального пути Ras/MEK/ERK влияет скорее не на скорость деградации белка E1A, а на эффективность трансляции.

Используя ингибитор протеасом лактацистин, мы установили, что базальный уровень белка E1A увеличивается при добавлении лактацистина, то есть в норме E1A утилизируется в протеасомах, что согласуется с результатами выявления роли протеасом в деградации изоформ E1A [34]. В отличие от базального уровня белка E1A, который повышался при действии лактацистина, его содержание снижалось в условиях ингибирования протеасом при длительном воздействии бутирата натрия. Это означает, что ИГД-зависимая деградация E1A происходит не по убиквитин-протеасомному пути, что указывает на индукцию альтернативного механизма дестабилизации E1A при действии ИГД в *ras*-трансформированных клетках.

Как ингибитор обширного класса деацетилаз гистонов, которые используют в качестве субстрата



и негистоновые белки, бутират натрия может влиять на состояние ацетилированности белка E1A. Белок E1A ацетируется по Lys239 в С-концевом домене его клеточными кофакторами ацетилтрансферазами СВР, р300 и рCAF, что препятствует его ядерной локализации из-за нарушения связывания с импортином-α [26] и делает его доступным для систем деградации.

Известно, что постоянная активация Ras-сигнального пути приводит к индукции транскрипционного фактора HSF1, контролирующего экспрессию белков теплового шока [35], что дает возможность предположить вовлеченность Hsp-зависимого механизма деградации [36] в ИГД-зависимой дестабилизации белка E1A. Тем не менее, вклад шаперон-опосредованной аутофагии в утилизацию белка E1A требует экспериментального подтверждения.

## ВЫВОДЫ

1. Активированный Ras стабилизирует E1A через активацию нижележащей киназы ERK.
2. При действии бутирата натрия на клетки с активированным Ras происходит стремительное

падение уровня белка E1A, индуцированное ИГД-зависимой инактивацией киназы ERK.

3. В норме E1A утилизируется путем протеасомной деградации, однако при длительном действии бутирата натрия деградация E1A наблюдается даже в условиях ингибирования протеасом, а значит, ИГД-зависимая деградация E1A происходит не по убиквитин-протеасомному пути.

4. Наши результаты указывают на то, что ИГД-индуцированная деградация E1A может приводить к снижению его проапоптотического потенциала в клетках с активированным Ras, поэтому возможность применения E1A в сочетании с ИГД в комбинированной терапии опухолей с мутантным активированным Ras ограничена. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 22-25-20229 и частично Фонда директора Института цитологии РАН. Клеточные линии получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-683).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berk A.J. // *Cancer Surv.* 1986. V. 5. № 2. P. 367–387.
2. Pelka P., Ablack J.N.G., Torchia J., Turnell A.S., Grand R.J.A., Mymryk J.S. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 4. P. 1095–1106.
3. Deng Q., Li Y., Tedesco D., Liao R., Fuhrmann G., Sun P. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 18. P. 8298–8307.
4. Reed J.C., Haldar S., Croce C.M., Cuddy M.P. // *Mol. Cell Biol.* 1990. V. 10. № 8. P. 4370–4374.
5. Cuconati A., Degenhardt K., Sundararajan R., Anselm A., White E. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 9. P. 4547–4558.
6. Byrd P.J., Grand R.J., Gallimore P.H. // *Oncogene.* 1988. V. 2. № 5. P. 477–484.
7. Gallimore P.H., Grand R.J., Byrd P.J. // *Anticancer Res.* 1986. V. 6. № 3. P. 499–508.
8. Chang Y.-W., Hung M.-C., Su J.-L. // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 2014. V. 62. № 3. P. 195–204.
9. Frisch S.M., Reich R., Collier I.E., Genrich L.T., Martin G., Goldberg G.I. // *Oncogene.* 1990. V. 5. № 1. P. 75–83.
10. Liao Y., Hung M.-C. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 17. P. 5938–5942.
11. Radke J.R., Siddiqui Z.K., Figueroa I., Cook J.L. // *Cell Death Discov.* 2016. V. 2. P. 16076–16076.
12. Sánchez-Prieto R., Quintanilla M., Cano A., Leonart M.L., Martin P., Anaya A., Ramón y Cajal S. // *Oncogene.* 1996. V. 13. № 5. P. 1083–1092.
13. Yamaguchi H., Chen C.-T., Chou C.-K., Pal A., Bornmann W., Hortobagyi G.N., Hung M.-C. // *Oncogene.* 2010. V. 29. № 41. P. 5619–5629.
14. Seto E., Yoshida M. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. V. 6. № 4. P. a018713.
15. Morshneva A., Gnedina O., Marusova T., Igotti M. // *Cells.* 2019. V. 9. № 1. P. 97.
16. Davie J.R. // *J. Nutr.* 2003. V. 133. № 7 Suppl. P. 2485S–2493S.
17. Liu H., Wang J., He T., Becker S., Zhang G., Li D., Ma X. // *Adv. Nutr. Bethesda Md.* 2018. V. 9. № 1. P. 21–29.
18. Wang W., Fang D., Zhang H., Xue J., Wangchuk D., Du J., Jiang L. // *OncoTargets Ther.* 2020. V. 13. P. 4691–4704.
19. Slavicek J.M., Jones N.C., Richter J.D. // *EMBO J.* 1988. V. 7. № 10. P. 3171–3180.
20. Turnell A.S., Grand R.J.A., Gorbea C., Zhang X., Wang W., Mymryk J.S., Gallimore P.H. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 17. P. 4759–4773.
21. Guan H., Ricciardi R.P. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 10. P. 5594–5602.
22. Song S., Cong W., Zhou S., Shi Y., Dai W., Zhang H., Wang X., He B., Zhang Q. // *Asian J. Pharm. Sci.* 2019. V. 14. № 1. P. 30–39.
23. Downward J. // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. № 1. P. 11–22.
24. Fernández-Medarde A., Santos E. // *Genes Cancer.* 2011. V. 2. № 3. P. 344–358.
25. Поспелова Т.В., Кислякова Т.В., Медведев А.В., Светликова С.Б., Поспелов В.А. // *Цитология.* 1990. Т. 32. № 2. С. 148–155.
26. Madison D.L., Yaciuk P., Kwok R.P.S., Lundblad J.R. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 41. P. 38755–38763.
27. Иготи М.В., Светликова С.Б., Поспелов В.А. // *Acta Naturae.* 2018. Т. 10. № 4. С. 70–78.
28. Saha B., Parks R.J. // *J. Virol.* 2019. V. 93. № 12. P. e00088–19.
29. Morshneva A., Gnedina O., Svetlikova S., Pospelov V., Igotti M. // *AIMS Genet.* 2018. V. 5. № 1. P. 41–52.
30. Popik W., Pitha P.M. // *Virology.* 1998. V. 252. № 1. P. 210–217.
31. Bruder J.T., Kovesdi I. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 1. P. 398–404.
32. Schümann M., Dobbstein M. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 3. P. 1282–1288.
33. Whalen S.G., Marcellus R.C., Whalen A., Ahn N.G., Ricciardi R.P., Branton P.E. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 5. P. 3545–3553.
34. Radko S., Jung R., Olanubi O., Pelka P. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 10. P. e0140124.
35. Dai C. // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2018. V. 373. № 1738. P. 20160525.
36. Cuervo A.M. // *Trends Endocrinol. Metab.* 2010. V. 21. № 3. P. 142–150.

УДК 577.27, 57.083.3

# Антитела против необычных форм сиалилированных гликанов

П. С. Обухова<sup>1,2</sup>, М. М. Зиганшина<sup>2</sup>, Н. В. Шилова<sup>1,2</sup>, А. А. Чинарев<sup>1</sup>, Г. В. Пазынина<sup>1</sup>, А. Ю. Нокель<sup>1,2</sup>, А. В. Терентьева<sup>2</sup>, Н. Р. Хасбиуллина<sup>2</sup>, Г. Т. Сухих<sup>2,3</sup>, А. А. Рагимов<sup>3</sup>, Э. Л. Салимов<sup>3</sup>, В. И. Бутвиловская<sup>4</sup>, С. М. Полякова<sup>1,5</sup>, Д. Саха<sup>6</sup>, Н. В. Бовин<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

<sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup>Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

<sup>5</sup>ООО «Синтавр», Москва, 117997 Россия

<sup>6</sup>Центр биомедицинских исследований, Институт последипломного медицинского образования имени Санджая Ганди, Лакхнау, 226014 Индия

<sup>7</sup>Центр технологических инноваций Kode, Оклендский технологический университет, Окленд, 1010 Новая Зеландия

\*E-mail: professorbovin@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.11.2021

Принята к печати 16.03.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11631

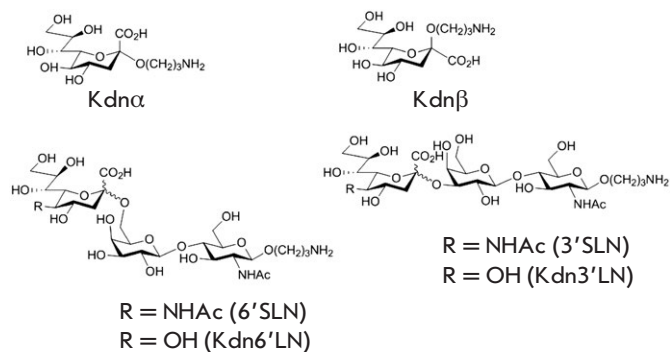
**РЕФЕРАТ** Ранее мы показали, что в крови здоровых доноров: (1) отсутствуют естественные антитела против гликопротеинов, содержащих Neu5Ac $\alpha$  (N-ацетилнейраминовую кислоту) – наиболее распространенную форму сиаловой кислоты человека, (2) в невысоких титрах присутствуют антитела, способные связывать олигосахариды, отличающиеся от типичных сиалилированных гликанов млекопитающих только тем, что природная  $\alpha$ -гликозидная форма Neu5Ac заменена на  $\beta$ Neu5Ac. В данной работе мы более подробно исследовали антитела против  $\beta$ Neu5Ac, а также проверили предположение о Kdn (2-кето-3-дезоксид-*D*-глицеро-*D*-галактононулозоновой кислоте) как возможной причине появления этих антител в крови человека, принимая во внимание ожидаемую перекрестную реактивность с Kdn-гликанами, которые встречаются в бактериальных гликоконъюгатах как в  $\alpha$ -, так и в  $\beta$ -формах. Мы наблюдали взаимодействие иммуноглобулинов периферической крови с сиалиллактозаминами (где «сиалил» представляет собой Kdn или нейраминовую кислоту) только у очень ограниченного числа доноров, в то время как с моносахаридом Kdn взаимодействовали все образцы, независимо от конфигурации гликозидной связи остатка Kdn, причем уровень связывания некоторых из них был высоким. Это означает, что бактериальные Kdn-гликоконъюгаты вряд ли инициируют образование антител к  $\beta$ Neu5Ac-содержащим гликанам у человека. Чтобы найти причину появления этих антител, мы сосредоточились на неинфекционных патологиях, а также на беременности, при которой происходят значительные изменения в иммунной системе, что обусловлено развитием толерантности к аллоантигенам плода. В результате, в крови большинства (2/3) обследованных беременных женщин мы обнаружили иммуноглобулины класса M, направленные к Neu5Ac $\beta$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ; кроме того, из плаценты были элюированы иммуноглобулины класса G против Neu5Ac $\beta$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$  и Neu5Ac $\beta$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ . Предполагается, что обнаруженные антитела выполняют функцию блокирования антигенов плода.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** сиалилированные гликаны, Kdn, естественные антитела человека, беременность, гликоцип.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЗРП – задержка роста плода; ПЭ – преэклампсия; Gal – галактоза; GalNAc – N-ацетилгалактозамин; GlcNAc – N-ацетилглюкозамин; Kdn – 2-кето-3-дезоксид-*D*-глицеро-*D*-галактононулозоновая кислота; LN – N-ацетиллактозамин Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ; Neu5Ac – N-ацетилнейраминовая кислота; Neu5Gc – N-гликолилнейраминовая кислота; RFU – относительные единицы флуоресценции; SLN – сиалиллактозамин.

## ВВЕДЕНИЕ

В клетках животных наиболее распространены две формы сиаловой кислоты – Neu5Ac и Neu5Gc. В составе гликопротеинов сиаловые кислоты обычно находятся в терминальных позициях сложных гликанов, где они  $\alpha$ 2,3- или  $\alpha$ 2,6-связаны с остатком Gal, или  $\alpha$ 2,6- – с остатком GalNAc. Сиалилированные гликаны участвуют в многочисленных процессах биологического распознавания [1], поэтому не удивительно, что антитела (т.е. аутоантитела) к Neu5Ac-гликанам не детектируются у здоровых людей [2]. Однако обнаружены антитела к некоторым не встречающимся в природе олигосахаридам, содержащим Neu5Ac в  $\beta$ -форме [2]. Для того чтобы объяснить их происхождение и предназначение, была выдвинута гипотеза о том, что наблюдаемые антитела против  $\beta$ Neu5Ac на самом деле нацелены на фрагменты полисахаридов/липополисахаридов бактерий *Streptomyces*, *Klebsiella* и др. (<http://csdb.glycoscience.ru/database/>), которые часто содержат структурно похожую сиаловую кислоту, а именно 2-кето-3-дезоксид-*D*-глицеро-*D*-галактононулозоновую кислоту (Kdn) в  $\beta$ -аномерной форме [2, 3]. В пользу этого свидетельствует присутствие в крови здоровых доноров антител к Kdn-гликанам, типичным для липополисахаридов [4]. Поэтому мы исследовали человеческие антитела с использованием «сиалового» гликоципа, содержащего моносахариды  $\alpha$ - и  $\beta$ -Kdn [5], синтетические 6'- и 3'-сиалиллактозамины, где остаток сиаловой кислоты – это Kdn, а также соответствующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -Neu5Ac-производные (схема 1). Анализировали сыворотки крови условно здоровых доноров и женщин с физиологической и осложненной беременностью. В этой статье мы обсуждаем возможные причины появления антител, направленных против  $\beta$ -форм сиаловых кислот.



**Схема 1.** Структуры синтетических Kdn-гликанов, используемых в этой работе (в составе сиаловой версии гликоципа), и соответствующих трисахаридов, содержащих Neu5Ac

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Kdn-гликаны

Kdn-гликаны получены в виде индивидуальных аномеров (95% чистоты по данным ВЭЖХ и ЯМР) [5], конфигурация сиалозидной связи была подтверждена химическими сдвигами и константами спин-спинового взаимодействия, типичными для H-3 протонов Kdn, как описано в [5].

### Доноры и пациенты

Исследованы биологические образцы от 104 индивидов: 16 доноров (8 женщин и 8 мужчин) из Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Москва, Россия) – группа 1; ретроспективная выборка, включающая 88 пациенток из Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии (Москва, Россия), отобранных для участия в исследовании (табл. 1): 26 небеременных здоровых женщин, обратившихся в Центр для планирования беременности (группа 2); 30 пациенток с нормальной беременностью (группа 3); 32 пациентки с осложненной беременностью (группа 4), включающие 41% пациенток с преэклампсией (ПЭ), 25% с задержкой роста плода (ЗРП) и 34% с ПЭ в сочетании с ЗРП. Клинические характеристики групп представлены в табл. 2. Критерии включения в группу 1: возраст от 18 лет, отсутствие абсолютных противопоказаний для донорства, нормальные показатели общего анализа крови, биохимического анализа крови, коагулограммы и артериального давления. Критерии включения в группу 2: наличие беременности в анамнезе, наступившей в естественном цикле без использования вспомогательных репродуктивных технологий, нормальный менструальный цикл, отсутствие гормональных нарушений. Критерии включения в группу 3: отсутствие хронических гинекологических или соматических заболеваний, отсутствие воспалительных заболеваний в стадии обострения, неосложненное течение беременности, отсутствие медикаментозной терапии (за исключением витаминов или минеральных добавок), нормальная флора влагалища и нормальные результаты ультразвукового исследования и доплерографии во время текущей беременности. Критерии включения в группу 4: беременность, осложненная ПЭ и/или ЗРП. Все беременные пациентки имели спонтанную одноплодную беременность и родоразрешались путем кесарева сечения. Пациентки с HELLP-синдромом (атипичной формой тяжелой преэклампсии, которая характеризуется симптомами: H (hemolysis) – внутрисосудистый гемолиз, EL (elevated liver enzymes) – повышение печеночных

Таблица 1. Образцы и соответствующие версии гликоципов

Группа	Индивиды, число	Биоматериал	Образцы, число	Версия гликоципа	Источник биоматериалов	
1	Здоровые доноры	16	Сыворотки крови	16	#1 Сиаловый гликоцип (17 олигосахаридов)	Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия
2	Здоровые небеременные женщины (доноры)	26	Сыворотки крови	26	#3 (441 олигосахарид и 219 бактериальных полисахаридов)	
3	Беременные здоровые женщины	30	Сыворотки крови	26	#2 (381 олигосахарид)	
			Элюаты из плаценты	30		
4	Женщины с осложненной беременностью	32	Сыворотки крови	29	#2 (381 олигосахарид)	Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва, 117997 Россия
			Элюаты из плаценты	32		

Таблица 2. Клиническая характеристика исследуемых групп

Признак	Группа 1 здоровые доноры	Группа 2 небеременные здоровые пациентки	Группа 3 пациентки с нормальной беременностью	Группа 4 пациентки с осложненной беременностью	p-критерий*
Возраст доноров и пациентов, лет**	33.0 (18–62)	30.0 (24–44)	32.5 (23–40)	34.5 (24–45)	0.2253
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.**	нормотензивные	118.0 (110–120)	110.0 (103–130)	150.0 (110–210)	<0.0001
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.**		75.0 (70–82)	70.0 (60–80)	95.0 (70–115)	<0.0001
Гестационный возраст новорожденных при родах, недели***	-	-	39.2 (39.0–40.0)	34.8 (30.40–37.20)	<0.0001
Вес новорожденных, г**	-	-	3462.0 (2800–4180)	1997.0 (440–3300)	<0.0001
Оценка новорожденных по шкале Апгар**	-	-	8.0 (8)	7.0 (2–8)	<0.0001

\* Сравнение групп 3 и 4.

\*\* Данные представлены в виде медиан с минимальными и максимальными значениями, использован U-критерий Манна–Уитни.

\*\*\* Данные представлены в виде медиан с межквартильным диапазоном, использован U-критерий Манна–Уитни.

ферментов, LP (low platelet count) – снижение уровня тромбоцитов в крови) были исключены из исследования. Критериями исключения для всех групп были: тяжелые соматические заболевания, включая аутоиммунные, острые и хронические воспалительные заболевания в стадии обострения, гемотрансфузии или трансплантация органов в анамнезе, иммунотерапия, гормонотерапия и применение препаратов, влияющих на выработку и биодоступность антител, включая низкомолекулярные гепарины.

Все пациентки дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом соответствующих медицинских организаций.

#### Диагностические критерии преэклампсии и задержки роста плода

Включение пациенток в группы осуществлялось в соответствии с критериями Международного общества по изучению артериальной гипертензии



во время беременности (ISSHP) [6]. Пренатальная диагностика ЗРП основывалась на критериях, описанных в [7]. Клинические характеристики исследуемых групп приведены в *табл. 2*.

### Сбор образцов сывороток крови

В группе 1 образцы сывороток крови получены с помощью вакуумных пробирок для сбора крови VACUETTE® с красной крышкой с активатором образования сгустка и гелем для разделения (4 мл,  $L \times \varnothing = 75 \times 13$  мм). В ретроспективной когорте образцы сывороток крови собраны в вакуумные пробирки для сбора крови S-Monovette® Serum, с белой крышкой, с активатором образования сгустка (4.9 мл,  $L \times \varnothing = 90 \times 13$  мм). В течение 1 ч после забора крови образцы центрифугировали в течение 10 мин при 2000 *g* и хранили до анализа антител при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Элюция антител из ткани плаценты

От пациенток из групп 3 и 4 во время кесарева сечения получали плаценту и элюировали плацента-ассоциированные антитела, как описано ранее [8], используя 10.0 г ткани плаценты (производили забор главным образом ворсинчатого хориона, базальной и хориальной пластинки). От каждой пациентки забирали одинаковое количество ткани плаценты. Образцы элюатов с ингибитором протеазы SIGMAFAST (S8820, Sigma-Aldrich, MO, США) в концентрации, рекомендованной производителем, хранили максимум 7 дней при  $4^{\circ}\text{C}$  до исследования. Элюированные антитела анализировали на гликочипах без разбавления, с детекцией только IgG (методика проведения анализа описана ниже).

### Гликочип

Использовали гликочипы трех форматов (ООО «Семиотик», Россия): #1 – содержащие только сиалилированные гликаны (около 20 гликанов, далее эту версию называли сиаловой версией чипа), #2 – содержащие 381 олигосахарид, #3 – содержащие 441 олигосахарид и 219 бактериальных полисахаридов; в состав второй и третьей версии входили все сиалилированные гликаны первой. Чистота гликанов составляла 95–98% согласно данным ВЭЖХ и ЯМР. Печать гликанов осуществляли в соответствии с международными правилами, изложенными в [4]. Каждый лиганд на чипе был нанесен в 6–12 повторах; факт иммобилизации подтверждали с помощью стандартной плазмы крови человека, моноклональных и аффинно-выделенных поликлональных антител, а также с помощью растительных лектинов согласно протоколу контроля качества производителя.

Сыворотки крови и элюаты из плаценты анализировали с использованием гликочипа как описано в [4] и [8] соответственно. Соответствие образцов и форматов чипа приведено в *табл. 1*. Полученные результаты представляли в виде медианы относительных единиц флуоресценции (RFU) по повторам каждого гликана. Величину фона определяли как сигнал от поверхности, не содержащей лиганда. Пороговое значение рассчитывали как величину фона, умноженную на 10. Сигналы, превышающие пороговый уровень, считали значимыми. Частоту встречаемости данных антител рассчитывали как процент (%) числа индивидов, у которых была исследована сыворотка крови и медиана значений RFU у данного гликана превышала пороговое значение.

### Статистический анализ

Статистический анализ проведен с использованием программного обеспечения MedCalc версии 16.4 (MedCalc, Бельгия). Для межгрупповых сравнений применен U-критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при *p* менее 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2-Кето-3-дезоксид-*D*-глицеро-*D*-галактононулоновая кислота, или Kdn, широко распространена в природе и обнаруживается в заметных количествах у бактерий и холоднокровных позвоночных. Остаток Kdn присоединен к углеводной цепи гликолипидов, гликопротеинов, бактериальных капсульных полисахаридов и липополисахаридов связями 2-3, 2-4, 2-6 или 2-8. Kdn обнаруживается во всех типах гликоконъюгатов в различных органах человека, но в крайне низких количествах (0.1–1% от общего содержания сиаловых кислот) [9]. Считается, что Kdn поступает в метаболическую систему человека с пищей, как и Neu5Gc [10]; несколько повышенная экспрессия Kdn обнаружена в эритроцитах плода по сравнению с клетками взрослого человека и в опухолевых тканях яичников [9]. Kdn широко распространена в организмах, с которыми контактирует человек и, безусловно, является моносахаридом, чужеродным для человека, даже его  $\alpha$ -связанная форма.

При тестировании 16 образцов сывороток крови здоровых доноров (группа 1) с помощью сиаловой версии гликочипа мы не обнаружили IgG ни против Kdn $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$  (Kdn $\alpha$ 2-3'LN) и Kdn $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$  (Kdn $\alpha$ 2-6'LN), ни против соответствующих Kdn $\beta$ -версий (*рис. 1*). Однако в этой небольшой выборке мы не выявили антител и против  $\alpha$ -связанной формы Kdn в составе Kdn $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ , хотя исследовательская группа A. Varki детектировала с помощью аналогичного

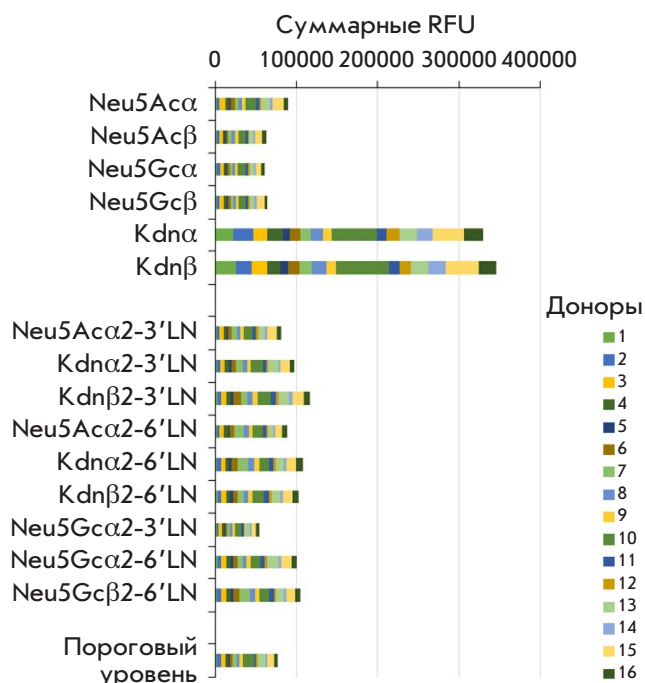


Рис. 1. Связывание человеческих сывороточных антител IgG класса (от 16 доноров) с сialiрированными гликанами. Результаты сialiрированной версии гликоципа (формат #1) представлены в виде диаграммы накопления, т.е. значения RFU для всех донорских образцов суммировались

гликоципа антитела IgG против этого трисахарида у ограниченного числа доноров [10, 11]. Мы обратили внимание на это несоответствие и извлекли наши данные по условно здоровым женщинам, где использовалась полная версия гликоципа, в составе которого присутствовал трисахарид Kdnα2-3Galβ1-4GlcNAcβ. Согласно этим данным, представленным на рис. 2, 15 из 26 женщин действительно имели антитела к этому трисахариду, но они относились

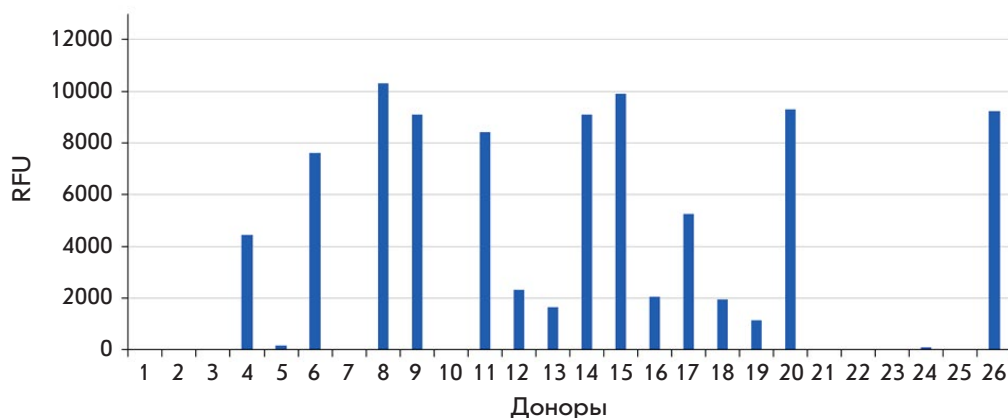


Рис. 2. В крови 15 из 26 здоровых доноров присутствуют антитела (IgM) к трисахариду Kdnα2-3Galβ1-4GlcNAcβ. Представлены результаты гликоципа формата #3. Значения RFU порогового уровня вычтены

только к классу IgM, в то время как IgG-антитела не обнаружены. Информация об исследуемых образцах и соответствующих версиях гликоципов приведена в табл. 1.

Мы объясняем вышеуказанное расхождение между результатами тем, что антитела, способные связываться с Kdn-формой сialiрированного лактозамина, образуются в ответ на бактериальные инфекции (т.е. мы имеем дело с адаптивными иммуноглобулинами), которые появляются с разной частотой в разных небольших когортах в зависимости от региона, времени года и т.д.

В отличие от описанных выше данных по Kdn-трисахариду, у большинства здоровых доноров группы 1 наблюдался умеренный (или спорадически высокий) уровень антител IgG класса к моносахариду Kdn (рис. 3) и, что примечательно, почти одинаковый для α- и β-форм. Наблюдаемые сигналы от моносахарида Kdn у высокореагирующих доноров оказались близкими к значениям RFU для L-рамнозы, которую использовали здесь в качестве эталона высокого связывания, в то время как антитела к моносахариду Neu5Ac (как α-, так и β-формы) не обнаружены (рис. 1), что подтверждается ранее опубликованными данными [4]. Бактериальные полисахариды, к основной цепи которых Kdn присоединена в виде бокового заместителя, по-видимому, являются гликотопами для широко распознающих антител, которые связываются с моносахаридом Kdn.

Отсутствие у здоровых доноров антител к трисахаридам, в которых остаток Kdn связан β-гликозидной связью, указывает на то, что липополисахариды, содержащие Kdn, вряд ли можно рассматривать как стимул появления обнаруженных ранее [2] антител против гликанов, содержащих β-связанную Neu5Ac.

Однако анти-Kdn-антитела не были предметом данного исследования. Нам было важно пред-

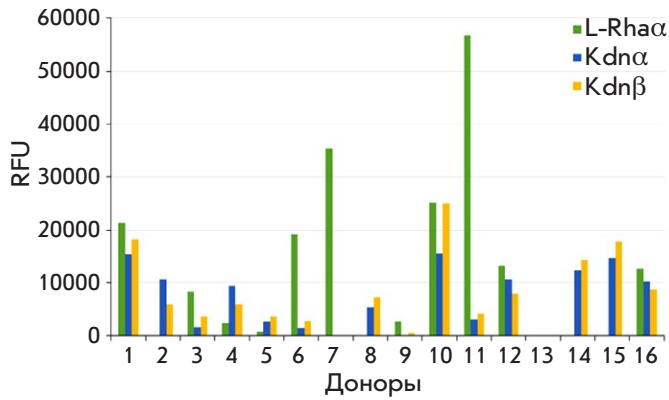


Рис. 3. Связывание человеческих сывороточных антител IgG класса (группа 1, 16 доноров) с моносахаридом Kdn в его α- и β-спейсерированных формах, приведено сравнение с αL-рамнозой (L-Rhaα). Показаны результаты сиаловой версии гликочипа (формат #1). Значения RFU порогового уровня вычтены

ложить обоснованное объяснение происхождения и биологического значения ранее обнаруженных антител к Neu5Acβ-содержащим гликанам [2]. Как отмечалось выше, предположение о липополисахаридах как о триггере и мишени этих антител противоречит представленным экспериментальным данным, а именно отсутствию их связывания с Kdn-лактозаминами у подавляющего числа доноров и неспособности различать α- и β-формы моносахарида Kdn. Поэтому объяснение происхождения и функции антител к гликанам, содержащим βNeu5Ac, следует искать в другом направлении; первая такая попытка описана ниже.

Мы исследовали частоту встречаемости антител против Neu5Acβ2-3Galβ1-4GlcNAcβ и Neu5Acβ2-6Galβ1-4GlcNAcβ (т.е., β-форм 3'- и 6'-сиалиллактозаминов) в крови женщин с нормальной и осложненной развитием ПЭ и ЗРП беременностью. ПЭ и ЗРП относятся к группе больших акушерских синдромов, связанных с дефектами плацентации, и характеризуются развитием гипериммунного ответа на фетальные алло-антигены [12, 13]. Кроме антител крови, изучены элюаты из плацент беременных групп 3 и 4 (табл. 3, рис. 4). Частота встречаемости антител оказалась удивительно высокой (табл. 3, рис. 4), особенно в случае антител к 2-3-изомеру Neu5Acβ2-3Galβ1-4GlcNAcβ. Как уже упоминалось [2, 14], антитела к соответствующим α-сиалилированным гликанам практически отсутствовали у здоровых доноров. Их редко выявляли у женщин с нормальной беременностью, но обнаруживали при осложнениях беременности, что, по-видимому, связано с развитием иммунного ответа [15] и нарушением толерантности к плоду. Наши данные подтверди-

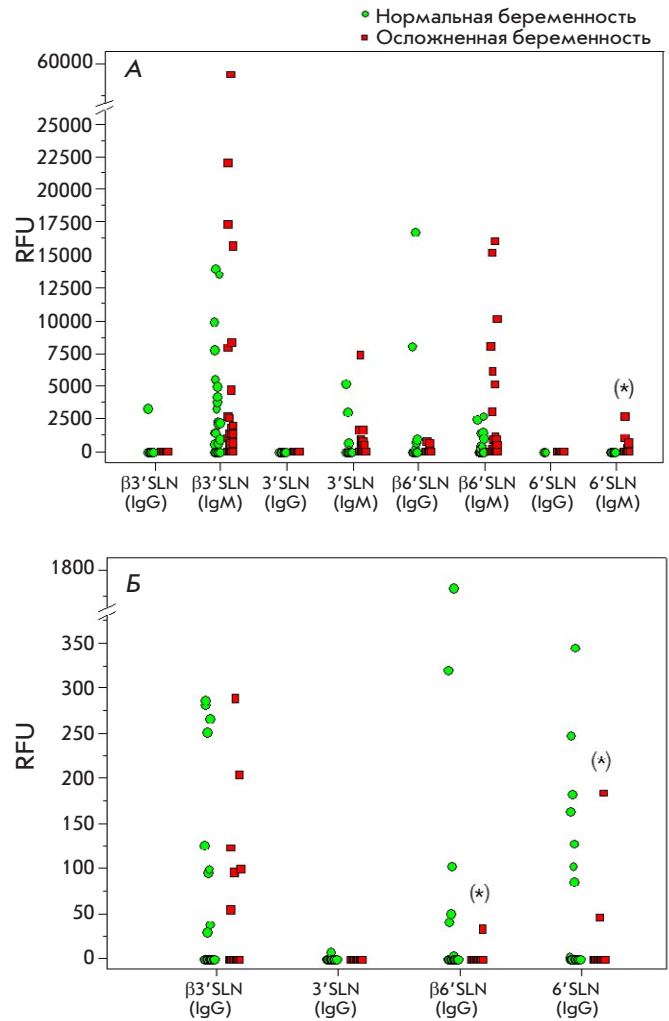


Рис. 4. Связывание сывороточных антител IgG и IgM классов (А) и элюированных плацента-ассоциированных антител IgG класса (Б) с трисахаридами 3'SLN и 6'SLN (сравнение Neu5Acβ- и Neu5Acα-форм). Представлены данные гликочипа формата #2 для 30 беременных здоровых женщин и 32 женщин с осложнениями беременности (ПЭ и ЗРП). Значения RFU порогового уровня рассчитаны для каждой группы отдельно (для сывороток и элюатов, для IgG и IgM) как описано в разделе «Экспериментальная часть». (\*) – значимые межгрупповые различия (U-критерий,  $p < 0.05$ )

ли это наблюдение. Примечательно, что антитела к βNeu5Ac-содержащим гликанам также обнаруживали довольно часто (в 20–30% случаев) в элюатах из плацент (табл. 3). Это были антитела, представленные только иммуноглобулинами класса G, что неудивительно, так как материнские иммуноглобулины класса M не проходят плацентарный барьер; в то же время антитела IgM класса к Neu5Acβ2-3Galβ1-4GlcNAcβ обнаруживались с высокой частотой

**Таблица 3.** Частота встречаемости соответствующих антител, узнающих сиалилированные гликаны. Этот параметр равен доли лиц (в %), у которых RFU был выше порогового значения

Сиалилированные гликаны	Доля пациенток с нормальной беременностью (кровь)		Доля пациенток с осложненной беременностью (кровь)		Доля пациенток с нормальной беременностью (плацента)	Доля пациенток с осложненной беременностью (плацента)
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgG
Структура						
Neu5Ac $\beta$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ( $\beta$ 3'SLN)	4	65	0	69	30	19
Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ( $\beta$ 3'SLN)	0	15	0	35	0	0
Neu5Ac $\beta$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ( $\beta$ 6'SLN)	19	31	7	45	20	3
Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ( $\beta$ 6'SLN)	0	0	0	17	27	6

той в материнской крови, тогда как IgG соответствующей специфичности в их крови отсутствовали. Поскольку в плаценте представлены фетальные антигены отцовского происхождения [16], мы предполагаем, что эти иммуноглобулины G, расположенные резидентно в плаценте и обнаруживаемые в элюатах, выполняют защитную роль от надзорной функции материнской иммунной системы, связываясь с алло-антигенами в плаценте; о чем свидетельствует их более низкая частота встречаемости у пациенток с осложненной беременностью. По-видимому, при ПЭ и ЗРП нарушается механизм маскировки алло-антигенов антителами с блокирующими свойствами. Это предположение согласуется с концепцией формирования во время беременности защитных блокирующих антител, маскирующих фетальные алло-антигены в плаценте от атаки иммунной системы матери [17, 18]. J. Gu и соавт. [19] показали, что защитные антитела класса IgG могут продуцироваться в плаценте, и они регулируют локальные иммунные реакции. Вторым (и более вероятным, на наш взгляд) объяснением того факта, что антитела обнаружены в ткани плаценты, но отсутствуют в периферической крови, является полное или почти полное их депонирование на плацентарных антигенах, в результате чего их содержание в крови становится ниже порога чувствительности метода обнаружения. Мы считаем, что  $\beta$ -сиалилированные гликаны являются не истинными эпитопами наблюдаемых антител, а мимотопами белковых антигенов, хотя прямых доказательств этому пока нет; это предположение в дальнейшем предполагает поиск истинных эпитопов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Профилирование антител человека с использованием обширного набора гликанов выявляет ряд иммуноглобулинов с неожиданной специфичностью, который включает антитела к  $\beta$ -Neu5Ac-содержащим гликанам. Целью данного исследования был поиск причин появления и особенностей функционирования

этих антител. Изначально мы предположили, что идентифицированные антитела направлены к Kdn-содержащим гликоконъюгатам бактериального происхождения, которые встречаются как в  $\alpha$ -, так и в  $\beta$ -связанных формах. Однако эта гипотеза не подтвердилась данными, представленными здесь, поэтому истинные антигены и физиологическую роль этих антител еще предстоит определить. В то же время мы обнаружили антитела этой необычной специфичности в крови (IgM) и ткани плаценты (IgG) при беременности, что дает основание для дальнейшего изучения роли обнаруженных антител в репродуктивной иммунологии.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Часть экспериментов проведена с использованием оборудования, предоставленного Центром коллективного пользования Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ) при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № RFMEFI 621117X0018). Авторы выражают благодарность лаборатории сбора и хранения биологического материала (Биобанк) Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова за предоставление образцов крови. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 18-53-45008 [Н.В. Шилова, А.А. Чинарев, Г.В. Пазынина, Н.В. Бовин] и № 19-015-00102 [М.М. Зиганшина, Н.Р. Хасбиуллина]) и Министерства науки и технологий правительства Индии (проект № INT/RUS/RFBFR/P-321 [Д. Саха]) в рамках сотрудничества DST и РФФИ.*

*Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.*



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Varki A. // *Nature*. 2007. V. 446. № 7139. P. 1023–1029. <https://doi.org/10.1038/nature05816>.
2. Shilova N., Huflejt M.E., Vuskovic M., Obukhova P., Navakouski M., Khasbiullina N., Pazynina G., Galanina O., Bazhenov A., Bovin N. // *Top. Curr. Chem.* 2015. V. 366. P. 169–181.
3. Deng L., Chen X., Varki A. // *Biopolymers*. 2013. V. 99. № 10. P. 650–665. <https://doi.org/10.1002/bip.22314>.
4. Obukhova P., Tsygankova S., Chinarev A., Shilova N., Nokel A., Kosma P., Bovin N. // *Glycobiology*. 2020. V. 30. № 6. P. 395–406. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz107>.
5. Chinarev A.A., Sablina M.A., Kunetskiy R.A., Shilova N.V., Polyakova S.V., Paramonov A.S., Saha J., Bovin N.V. // *Mendeleev Commun.* 2021. V. 31. № 4. P. 490–492.
6. Brown M.A., Magee L.A., Kenny L.C., Karumanchi S.A., McCarthy F.P., Saito S., Hall D.R., Warren C.E., Adoyi G., Ishaku S. // *Pregn. Hypert.* 2018. V. 13. P. 291–310. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.05.004>.
7. Ziganshina M.M., Kulikova G.V., Fayzullina N.M. Yarotskaya E.L., Shchegolev A.I., Le Pendu J., Breiman A., Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Bovin N.V., et al. // *Placenta*. 2020. V. 90. P. 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.12.005>.
8. Ignat'eva N.V., Ziganshina M.M., Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Bovin N.V., Tyutyunnik V.L., Sukhikh G.T. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019. V. 167. № 1. P. 120–122. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04474-4>.
9. Inoue S., Kitajima K. // *Glycoconj. J.* 2006. V. 23. № 5–6. P. 277–290. <https://doi.org/10.1007/s10719-006-6484-y>.
10. Kawanishi K., Saha S., Diaz S., Vaill M., Sasmal A., Siddiqui S.S., Choudhury B., Sharma K., Chen X., Schoenhofen I.C., et al. // *J. Clin. Invest.* 2021. V. 131. № 5. P. e137681. <https://doi.org/10.1172/JCI137681>.
11. Saha S., Coady A., Sasmal A., Kawanishi K., Choudhury B., Yu H., Sorensen R.U., Inostroza J., Schoenhofen I.C., Chen X., et al. // *mBio*. 2021. V. 12. № 1. P. e03226–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03226-20>.
12. Brosens I., Pijnenborg R., Vercruyssen L., Romero R. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011. V. 4. № 3. P. 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.009>.
13. Wilczynski J.R. // *Hum. Immunol.* 2006. V. 67. № 7. P. 492–511. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.04.007>.
14. Huflejt M.E., Vuskovic M., Vasiliu D., Xu H., Obukhova P., Shilova N., Tuzikov A., Galanina O., Arun B., Lu K., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 46. № 15. P. 3037–3049. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.06.010>.
15. Yang X., Zhang C., Chen G., Sun C., Li J. // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2019. V. 45. № 1. P. 39–46. <https://doi.org/10.1111/jog.13839>.
16. Deshmukh H., Way S.S. // *Annu. Rev. Pathol.* 2019. V. 14. P. 185–210. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012743>.
17. Barrientos G., Fuchs D., Schrocksnadel K., Ruecke M., Garcia M.G., Klapp B.F., Raghupathy R., Miranda S., Arck P.C., Blois S.M. // *J. Reprod. Immunol.* 2009. V. 79. № 2. P. 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2008.11.002>.
18. Malan Borel I., Gentile T., Angelucci J., Pivadori J., Guala M.C., Binaghi R.A., Margni R.A. // *J. Reprod. Immunol.* 1991. V. 20. № 2. P. 129–240. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(91\)90029-p](https://doi.org/10.1016/0165-0378(91)90029-p).
19. Gu J., Lei Y., Huang Y., Zhao Y., Li J., Huang T., Zhang J., Wang J., Deng X., Chen Z., et al. // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 2. P. 380–391. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu323>.

УДК 577.152.22, 577.112.083, 577.151.44, 577.151.45

# Выделение и биохимическая характеристика рекомбинантной транскетолазы *Mycobacterium tuberculosis*

Т. А. Щербакова<sup>1</sup>, С. М. Балдин<sup>1</sup>, М. С. Шумков<sup>2</sup>, И. В. Гущина<sup>3</sup>, Д. К. Нилов<sup>1</sup>, В. К. Швядас<sup>1,3\*</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071 Россия<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия

\*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 30.03.2022

Принята к печати 25.05.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11713

**РЕФЕРАТ** Фермент пентозофосфатного пути транскетолаза играет важную роль в жизнедеятельности микобактерий. С использованием плазмиды, несущей ген транскетолазы *Mycobacterium tuberculosis* с дополнительным гистидиновым тагом, проведены выделение и очистка препарата рекомбинантной бактериальной транскетолазы, определены условия получения апоформы белка. Определены значения константы Михаэлиса для кофактора тиаминдифосфата в присутствии ионов магния и кальция. Обнаружено, что сродство транскетолазы микобактерий к тиаминдифосфату на три порядка ниже, чем у фермента человека. Анализ структурной организации активных центров гомологичных ферментов показал, что данное отличие обусловлено заменой остатков лизина на менее полярные аминокислотные остатки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** транскетолаза, тиаминдифосфат, ксилулозо-5-фосфат, рибозо-5-фосфат, микобактерии.  
**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ТК – транскетолаза; hTK – транскетолаза человека; mbTK – транскетолаза микобактерий; yTK – транскетолаза дрожжей; ТДФ – тиаминдифосфат; К5Ф – ксилулозо-5-фосфат; Р5Ф – рибозо-5-фосфат.

## ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез является распространенным инфекционным заболеванием, вызываемым микобактериями *Mycobacterium tuberculosis*. Несмотря на многовековую борьбу с туберкулезом, до сих пор не существует лекарственных средств, позволяющих быстро и безопасно бороться с этим инфекционным заболеванием. В этой связи актуален поиск новых белковых мишеней, важных для жизнедеятельности микобактерий, и разработка соответствующих селективных ингибиторов. Геномный анализ штамма H37Rv [1] позволил определить ключевые биосинтетические процессы, среди которых можно отметить пентозофосфатный путь метаболизма углеводов.

Транскетолаза (ТК; [КФ 2.2.1.1]) – важный фермент пентозофосфатного пути, участвующий в расщеплении кетозы (субстрат-донор) и последующем

переносе двухуглеродного фрагмента на альдозу (субстрат-акцептор). Фермент обнаружен практически во всех тканях животных и растений, а также во многих микроорганизмах [2–4]. Есть основания полагать, что ТК *M. tuberculosis* (mbTK) участвует в синтезе углеводов, необходимых для строения бактериальной клеточной стенки [5]. Однако биохимические свойства mbTK пока мало изучены, что затрудняет эффективный поиск ингибиторов фермента. Опубликованы предварительные данные о субстратной специфичности mbTK, а также установлена одна кристаллическая структура (PDB ID 3rim) [6]. Целью данной работы были получение очищенного препарата и биохимическая характеристика рекомбинантной mbTK, изучение связывания фермента с кофактором тиаминдифосфатом (ТДФ), а также субстратами – ксилулозо-5-фосфатом (К5Ф) и рибозо-5-фосфатом (Р5Ф).

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

Рекомбинантную mbTK получали с использованием *Escherichia coli* штамм BL21(DE3). Трансформацию клеток осуществляли с помощью плазмиды pET-19b, несущей ген *Rv1449c* с гистидиновым тегом, а также ген устойчивости к ампициллину. Трансформированный штамм выращивали в среде LB в течение 12 ч, после чего переносили в качалочную колбу со средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение 6–7 ч (180 об/мин, 37°C). Экспрессию mbTK начинали, снижая температуру до 15°C, добавляя MgCl<sub>2</sub> или CaCl<sub>2</sub> (2 мМ), ТДФ (2 мМ), изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (0.2 мМ) и глицерин (2% по объему), и продолжали экспрессию в течение 24 ч. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин (4000 g, 4°C), ресуспендировали в фосфатном буфере (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 0.3 M NaCl), добавляли лизоцим (1 мг/мл) и инкубировали в течение 30 мин. Клетки разрушали ультразвуком при 0°C. Полученный лизат центрифугировали в течение 30 мин (12000 g, 4°C). Выделение белка mbTK, содержащего декагистидиновый фрагмент, проводили на колонках Protino Ni-TED 1000 (Macherey-Nagel) согласно протоколу производителя. Чистоту полученного препарата mbTK анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [7].

Стандартное измерение активности mbTK проводили по сопряженной реакции восстановления NAD<sup>+</sup>, катализируемой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из мышц кролика [8]. Система для измерения активности при pH 7.6 и 25°C содержала: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (3 Е), глицил-глицин (50 мМ), дитиотреитол (3.2 мМ), арсенат натрия (10 мМ), хлорид магния или кальция (2.5 мМ), ТДФ (200 мкМ), K5Ф (500 мкМ), P5Ф (2800 мкМ), NAD<sup>+</sup> (370 мкМ). Реакцию начинали добавлением раствора mbTK. Скорость реакции регистрировали по увеличению оптической плотности раствора при 340 нм в течение 3–5 мин. Измерения проводили с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800.

Удаление кофакторов для получения апоформы mbTK проводили по методике, изложенной в работе [9]. Для этого к раствору холофермента mbTK (0.2 мг/мл) в 10 мМ глицил-глициновом буфере, pH 7.4, добавляли насыщенный раствор сульфата аммония, pH 3.5, в соотношении 2 : 3, инкубировали во льду в течение 5 мин, затем центрифугировали в течение 15 мин (12000 g, 4°C). Осажденный белок растворяли в 50 мМ глицил-глициновом буфере, pH 7.4. Для определения константы связывания ТДФ апоформу mbTK инкубировали в 50 мМ глицил-глициновом буфере, pH 7.6, в присутствии

2.5 мМ двухвалентного катиона (Mg<sup>2+</sup> или Ca<sup>2+</sup>) при различной концентрации ТДФ (0–200 мкМ) в течение 45–60 мин при 25°C. Для стабилизации белка в пробу добавляли бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл). Затем в кювету вносили остальные компоненты, необходимые для измерения активности mbTK, реакцию начинали добавлением смеси субстратов. Значение константы Михаэлиса рассчитывали с использованием зависимости скорости реакции от концентрации кофактора, построенной в координатах Лайнуивера–Берка.

Константы связывания субстратов определяли с использованием стандартной методики, варьируя концентрацию исследуемого субстрата в пределах 0–100 мкМ для K5Ф и 0–215 мкМ для P5Ф. Концентрация второго субстрата при этом была постоянной и составляла 320 мкМ. Значение констант Михаэлиса рассчитывали построением зависимости скорости реакции от концентрации исследуемого субстрата в координатах Лайнуивера–Берка.

Для сравнения активных центров ТК разных организмов использовали кристаллическую структуру mbTK [6], структуру ТК дрожжей (yTK) [10] и человека (hTK) [11]. Последовательности ТК выравнивали в программе Matt 1.0 [12]. Визуализацию кристаллических структур осуществляли с помощью VMD 1.9.2 [13].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Рекомбинантный белок для изучения биохимических свойств mbTK получен путем трансформации штамма *E. coli* BL21(DE3) плазмидой, несущей ген *Rv1449c*. Обнаружено, что значительная часть (около 50%) получаемого белка находится в апоформе, которая быстро теряет активность в процессе выделения и очистки. Добавление кофактора ТДФ во время экспрессии позволило увеличить содержание холоформы до 75%, что привело к повышению удельной активности получаемого рекомбинантного препарата mbTK и позволило выделить необходимое количество активного фермента. Следует заметить, что в активном центре ферментов этого семейства содержится ион двухвалентного металла: hTK содержит магний, а yTK – кальций (замена иона металла возможна при реконструкции холоформы ТК из апоформы) [9, 14–16]. Единственная кристаллическая структура mbTK содержит Mg<sup>2+</sup> [6], однако предпочтительный тип иона металла при физиологических условиях еще предстоит определить. В процессе оптимизации условий получения рекомбинантной mbTK нами установлено, что выбор иона металла (Mg<sup>2+</sup> или Ca<sup>2+</sup>) при культивировании и экспрессии не оказывает влияния на конечный выход активного фермента.

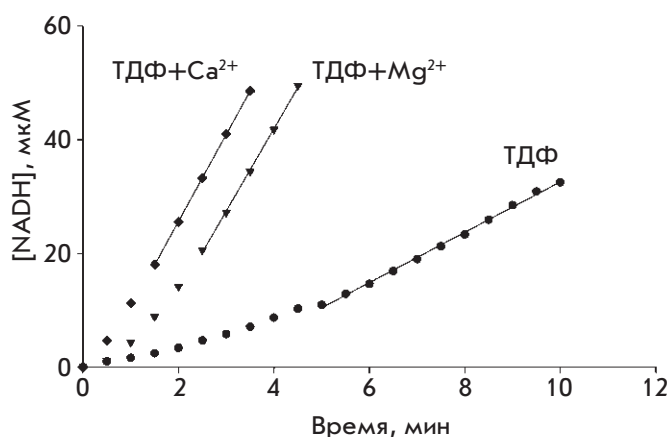


Рис. 1. Зависимость восстановления ферментативной активности от времени при добавлении ТДФ (200 мкМ) и ионов  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  (2.5 мМ) к апоформе mbTK

Таблица 1. Восстановление ферментативной активности при активации апоформы mbTK в присутствии и в отсутствие в среде ионов металлов и ТДФ

$Mg^{2+}/Ca^{2+}$ (2.5 мМ)	ТДФ (200 мкМ)	Остаточная активность, %
–	–	5
+	–	5
–	+	30
+	+	100

Для исследования связывания mbTK с кофактором ТДФ было необходимо получить апоформу белка. Известны различные методы удаления кофакторов: диализ, хроматография, осаждение сульфатом аммония. уTK утрачивает кофакторы при диализе в слабо щелочной среде [17], тогда как кофакторы hTK могут быть удалены лишь при осаждении сульфатом аммония в кислой среде [9]. В случае mbTK кофактор смогли удалить при осаждении сульфатом аммония в кислой среде (pH 3.5). Для активации апофермента и полноценного функционирования mbTK необходимо одновременное присутствие в активном центре иона металла и молекулы ТДФ (см. табл. 1). Следует отметить, что скорость активации апофермента и образования холофермента в присутствии  $Ca^{2+}$  выше, чем в присутствии  $Mg^{2+}$  (рис. 1). Кроме того, реконструкция холоформы mbTK при добавлении кофакторов происходит гораздо эффективнее при 25°C (по сравнению с 0°C).

При определении значения константы Михаэлиса для ТДФ апоформу mbTK предварительно инкубировали в растворе, содержащем двухвалентный ион металла и различные концентрации кофактора. Значение  $K_m$  в присутствии  $Mg^{2+}$  составило 57 мкМ,

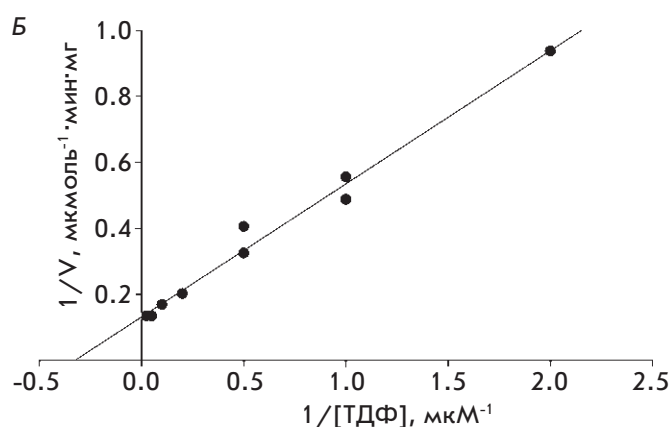
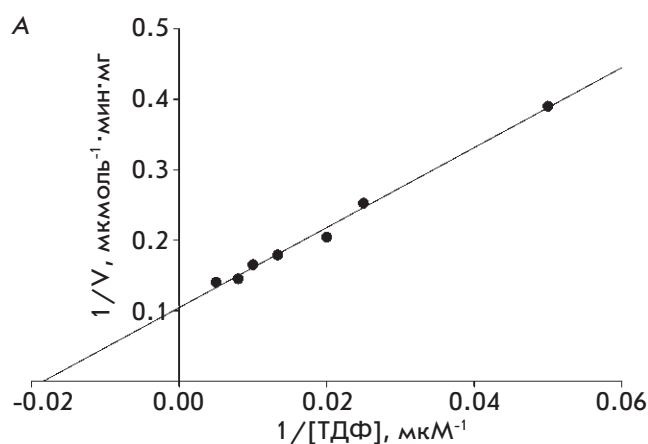


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой mbTK, от концентрации ТДФ и определение значения константы Михаэлиса в присутствии  $Mg^{2+}$  (А) и  $Ca^{2+}$  (Б)

Таблица 2. Значения  $K_m$  для ТДФ в реакциях, катализируемых ТК из различных организмов, в присутствии  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$

Фермент	$K_m (Mg^{2+})$ , мкМ	$K_m (Ca^{2+})$ , мкМ
hTK	0.074 [9]	не определено
yTK	0.22–4.4 [18]	0.032–0.250 [4, 14]
mbTK	57	3

в присутствии  $Ca^{2+}$  – 3 мкМ (рис. 2). Необходимо отметить, что сродство mbTK к кофактору существенно ниже, чем у гомологичных эукариотических ферментов (табл. 2). Так, у фермента дрожжей уTK значение  $K_m$  для ТДФ на порядок, а у фермента человека hTK – на три порядка лучше. Чтобы выяснить, какие взаимодействия в активном центре



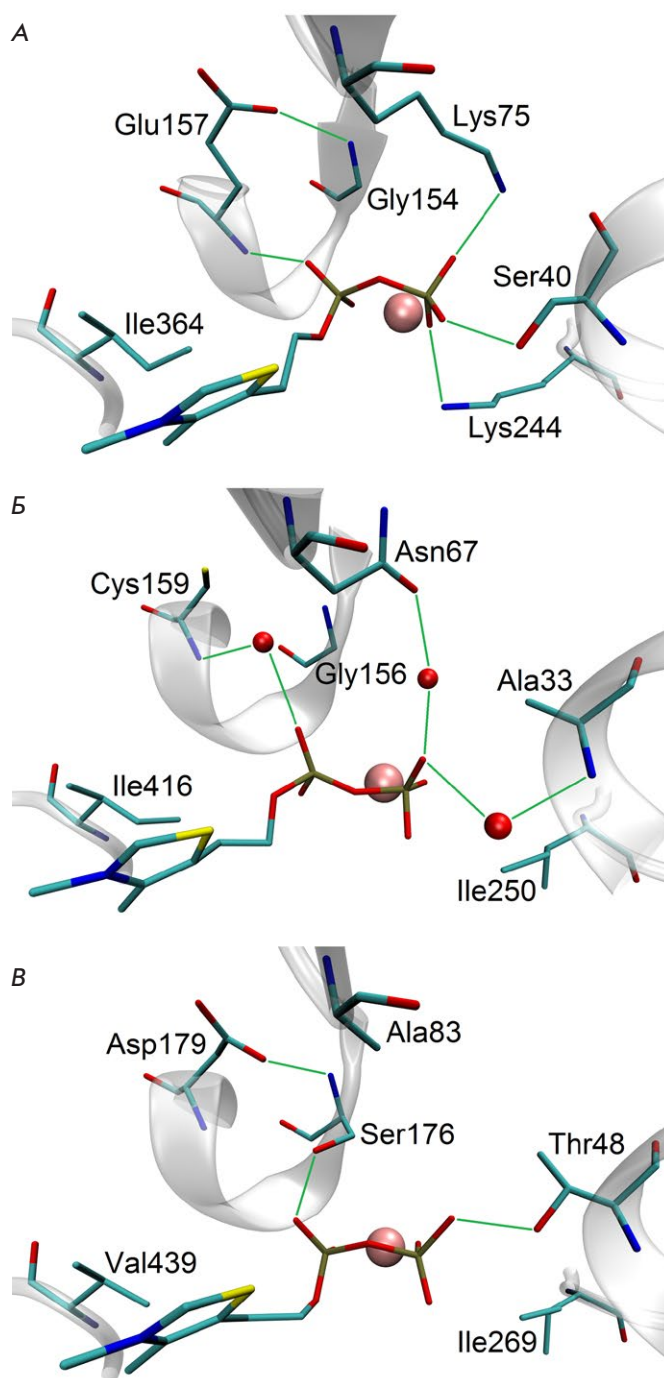
**Таблица 3.** Сродство к субстратам К5Ф и Р5Ф в реакциях, катализируемых ТК из различных организмов, в присутствии  $Mg^{2+}$

Фермент	$K_m$ (К5Ф), мкМ	$K_m$ (Р5Ф), мкМ
hTK	11 [9]	63 [9]
yTK	71 [9]	400 [20]
mbTK	30	134

столь существенно влияют на эффективность связывания кофактора, проведен анализ структурной организации участков связывания кофактора в кристаллических структурах mbTK (3rim), yTK (1ngs) и hTK (3mos).

В ферменте hTK человека существенный вклад в энергию связывания вносят остатки Lys75 и Lys244 за счет прямого электростатического взаимодействия с пирофосфатной группой ТДФ. Остатку Lys75 в yTK соответствует Asn67, который взаимодействует с пирофосфатной группой опосредованно (через молекулы воды), а в mbTK – Ala83, который не контактирует с ТДФ (рис. 3). Полярному остатку Lys244 соответствует гидрофобный остаток Ile250 в yTK и Ile269 в mbTK. Остаток Ile416 в yTK образует более плотный гидрофобный контакт с тиазольным фрагментом молекулы ТДФ по сравнению с Val439 в mbTK (рис. 3). Можно предположить, что указанные замены вносят основной вклад в снижение сродства к ТДФ в ряду hTK > yTK > mbTK. В то же время группа других вариабельных остатков Ser40/Ala33/Thr48, Gly154/Gly156/Ser176 и Glu157/Cys159/Asp179 (hTK/yTK/mbTK) прямо или опосредованно образует две водородные связи с пирофосфатной группой ТДФ во всех трех белках.

Свойства участков связывания субстратов в ферментах из разных источников различаются меньше, чем свойства участков связывания кофактора. Этот вывод подтверждают определенные нами значения  $K_m$  двух субстратов – для К5Ф и Р5Ф в реакциях, катализируемых mbTK в присутствии магния. Для этого исследовали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации одного из субстратов при избытке второго субстрата, при этом содержание второго субстрата не превышало максимальной концентрации варьируемого компонента более чем в 3.5 раза. Данное ограничение накладывали, принимая во внимание возможную конкуренцию субстратов за связывание в активном центре, обнаруженное у yTK [19]. Найденные значения  $K_m$ , составившие 30 мкМ для К5Ф и 134 мкМ для Р5Ф, сопоставимы со зна-



**Рис. 3.** Взаимодействия кофактора ТДФ с вариабельными остатками в активном центре гомологичных ферментов hTK (А), yTK (Б) и mbTK (В). Пиримидиновая часть молекулы ТДФ не показана. Ион двухвалентного металла окрашен розовым цветом. Зеленым цветом обозначены водородные связи

чениями  $K_m$  для этих субстратов в реакциях, катализируемых hТК и уТК (табл. 3), что согласуется с выводами о консервативности участка связывания.

## ВЫВОДЫ

С использованием плазмиды рЕТ-19b, несущей ген *Rv1449c*, получены препараты холо- и апоформ микобактериальной транскетолазы mbТК, проведены выделение и очистка рекомбинантного фермента. Показано, что микобактериальная транскетолаза mbТК по своим биохимическим свойствам существенно отличается как от гомологичного фермента человека hТК, так и от дрожжевого фермента уТК, что связано с заменой остатков лизина в активном

центре на менее полярные аминокислотные остатки. Обнаружено, что у mbТК сродство к кофактору почти на три порядка хуже по сравнению с hТК. Следовательно, низкомолекулярным соединениям проще конкурировать за участок связывания ТДФ в активном центре ТК микобактерий. Данный фактор обуславливает возможность разработки нового класса противобактериальных ингибиторов, селективно подавляющих активность mbТК и не оказывающих существенного действия на hТК. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского научного фонда  
(грант № 15-14-00069-П).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3<sup>rd</sup>, et al. // *Nature*. 1998. V. 393. P. 537–544.
- Schenk G., Duggleby R.G., Nixon P.F. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998. V. 30. P. 1297–1318.
- Севостьянова И.А., Селиванов В.А., Юршев В.А., Соловьева О.Н., Забродская С.В., Кочетов Г.А. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 972–976.
- Kochetov G.A., Solovjeva O.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1844. P. 1608–1618.
- Wolucka B.A. // *FEBS J.* 2008. V. 275. P. 2691–2711.
- Fullam E., Pojer F., Bergfors T., Jones T.A., Cole S.T. // *Open Biol.* 2012. V. 2. P. 110026.
- Laemmly U.K., Favre M. // *J. Mol. Biol.* 1973. V. 80. P. 575–599.
- Kochetov G.A. // *Methods Enzymol.* 1982. V. 90. P. 209–223.
- Мешалкина Л.Е., Соловьева О.Н., Хомак Ю.А., Друца В.Л., Кочетов Г.А. // *Биохимия*. 2010. Т. 75. С. 992–1000.
- Nilsson U., Meshalkina L., Lindqvist Y., Schneider G. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 1864–1869.
- Mitschke L., Parthier C., Schröder-Tittmann K., Coy J., Lüdtke S., Tittmann K. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 31559–31570.
- Menke M., Berger B., Cowen L. // *PLoS Comput. Biol.* 2008. V. 4. P. e10.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33–38.
- Kochetov G.A., Philippov P.P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970. V. 38. P. 930–933.
- Datta A.G., Racker E. // *J. Biol. Chem.* 1961. V. 236. P. 617–623.
- Кочетов Г.А. // *Биохимия*. 1986. Т. 51. С. 2010–2029.
- Sprenger G.A., Schörken U., Sprenger G., Sahm H. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 230. P. 525–532.
- Esakova O.A., Meshalkina L.E., Golbik R., Hübner G., Kochetov G.A. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 4189–4194.
- Соловьева О.Н., Мешалкина Л.Е., Ковина М.В., Селиванов В.А., Быкова И.А., Кочетов Г.А. // *Биохимия*. 2000. Т. 65. С. 1421–1424.
- Kochetov G.A., Sevostyanova I.A. // *IUBMB Life*. 2010. V. 62. P. 797–802.

УДК 57.083; 57.088

# Высокоаффинные однодоменные антитела для анализа апо- и голотрансферрина человека

С. В. Тиллиб\*, О. С. Горяйнова, А. М. Сачко, Т. И. Иванова

Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

\*E-mail: tillib@genebiology.ru

Поступило в редакцию 14.12.2021

Принято к печати 30.05.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11663

**РЕФЕРАТ** С использованием высокоэффективной технологии генерирования новых моноклональных однодоменных рекомбинантных антител (нанотел) получена панель нанотел, узнающих апо- и/или голотрансферрин человека. Проведен первичный анализ свойств двух вариантов новых нанотел, а также показаны уникальные потенциальные возможности их применения в диагностических исследованиях. Параллельное использование иммуносорбентов, создаваемых на основе этих нанотел, позволяет, по-видимому, выявлять изменения в относительной представленности апо- и голотрансферрина в биологических жидкостях человека. Такие изменения потенциально могут отражать повышенный риск или степень развития патологических процессов, например, злокачественных новообразований у человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** однодоменное антитело, нанотело, апо- и голотрансферрин, иммуносорбент, аффинная хроматография, диагностика.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** Holo-Tf и apo-Tf – железосодержащий и железонесодержащий белок трансферрин; нанотело – рекомбинантный белок, соответствующий вариabельному домену особых верблужьих антител, состоящих из гомодимера укороченных тяжелых цепей, при отсутствии легких цепей иммуноглобулинов.

## ВВЕДЕНИЕ

Железо – жизненно важный элемент, необходимый для осуществления ряда ключевых биологических процессов. Основными белками, регулирующими метаболизм железа в организме человека, являются трансферрин (Tf) и его рецепторы (TfR1 и TfR2) [1]. Высокая скорость пролиферации большинства опухолевых клеток, зависящая, в том числе, от поступления достаточного количества железа, часто ассоциирована с повышенной экспрессией TfR1 [2]. Tf – это гликопротеин размером 80 кДа, состоящий из двух субъединиц (N- и C- по 40 кДа). Каждая субъединица способна связывать один ион свободного трехвалентного железа ( $Fe^{3+}$ ), т.е. к Tf можно присоединить до двух ионов железа. Насыщенную железом форму Tf обозначают как holo-Tf. Не содержащая железо форма Tf, называемая apo-Tf, с высокой эффективностью связывает  $Fe^{3+}$  в крови и транспортирует его на поверхность клетки для интернализации посредством взаимодействия с TfR [3]. Клеточный рецептор TfR1 связывает holo-Tf с высокой аффинностью ( $K_d1 < 0.1$  нМ,

$K_d2 = 3.8$  нМ, pH 7.4), тогда как аффинность apo-Tf примерно в 100 раз меньше ( $K_d1 = 49$  нМ,  $K_d2 = 344$  нМ, pH 7.4) [4]. Комплекс железосвязанного Tf с рецептором, образующийся на поверхности клетки, интернализуется посредством клатрин-зависимого эндоцитоза. Работа протонного насоса в эндосомальной мембране приводит к снижению pH до 5.5 (закисление эндосомы), что запускает конформационные изменения как в Tf, так и в TfR1, что приводит к последующему высвобождению железа из Tf. Трехвалентное железо ( $Fe^{3+}$ ) превращается в двухвалентное железо ( $Fe^{2+}$ ), комплекс рецептор/apo-Tf затем возвращается на поверхность клетки, где apo-Tf высвобождается из связи с рецептором при нейтральных значениях pH [5].

Коэффициент насыщения трансферрина железом представляет собой широко используемый клинический параметр, который рассчитывается как отношение содержания железа в крови пациента к показателю общей железосвязывающей способности сыворотки крови [6]. Это довольно общая характеристика, которая не позволяет выявить тонкие из-

менения в относительной представленности разных форм трансферрина в крови при патологических процессах. Более адекватным инструментом для исследования таких вероятных тонких изменений могут быть специфические антитела. В данной работе мы описываем однодоменные антитела (нанотела) к разным формам трансферрина, полученные с помощью технологии, развиваемой и используемой в нашей лаборатории на протяжении многих лет [7–10].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазма периферической крови трех больных с диагнозом рак яичников IV стадии по классификации FIGO и образец мочи одного больного с инвазивным раком мочевого пузыря любезно предоставлены Национальным медицинским исследовательским центром радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. Плазму крови здоровых доноров получали по стандартному протоколу из проб крови, взятой у сотрудников с их согласия в медицинской лаборатории.

Полученные нами ранее библиотеки последовательностей, кодирующих нанотела [9], использовали при проведении новых процедур селекции с помощью модифицированного метода фагового дисплея как описано ранее [7–9]. В качестве антигенов-мишеней использовали коммерческие препараты holo-Transferrin human (holo-Tf) и apo-Transferrin human (apo-Tf) фирмы Sigma-Aldrich (США). Исходно отобранные последовательности однодоменных антител были переклонированы и оформатированы, после чего нанотела нарабатывали в периплазме бактерий, выделяли и очищали. Выделенные нанотела охарактеризованы с помощью электрофоретического и иммуноферментного анализа (ИФА) [7–9]. В ИФА для финальной детекции связавшегося конъюгата вторичных антител к НА-tagу с пероксидазой использовали реагент 1-Step Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific, США), добавляли 2 М серной кислоты и измеряли оптическую плотность (*OD*) при 450 нм. Получаемые в результате адаптационного переклонирования нанотела содержат на С-конце длинную линкерную последовательность (28 аминокислотных остатков длинного варианта шарнирного участка неканонического верблюжьего антитела), после которой идут два пептидных фрагмента: фрагмент из 9 аминокислот YPYDVPDYA (НА-tag) и последовательность из шести остатков гистидина (His-tag). Линкерный линейный участок содержит четыре удобно расположенных и хорошо доступных остатка лизина. По этим остаткам очень удобно проводить химические реакции пришивать другие молекулы, в том числе имму-

билизировать нанотело на BrCN-сефарозе. Нанотела пришивали к CNBr-активированной сефарозе 4В (GE Healthcare Life Sciences, США) согласно рекомендациям производителя и как описано ранее [8, 9]. Таким образом получали новые иммуносорбенты (иммуноаффинные колонки), специфичность которых определялась свойствами иммобилизованного нанотела. Иммуносорбенты с иммобилизованными нанотелами использовали для выделения связываемых белков как описано ранее [8, 9].

Константы связывания нанотел с каждой из форм трансферрина (holo-Tf и apo-Tf) в стандартном фосфатно-солевом буфере (PBS) pH 7.4 определяли на микрокалориметре MicroCal PEAQ-ITC (Malvern, Швейцария), используя прилагаемую к прибору программу (MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software) в Центре коллективного пользования ИБГ РАН. Модель подгонки – два сайта последовательного связывания – однозначно следовала из получаемых данных.

Для электрофоретического анализа белков отбирали аликвоты элюатов и анализировали в 5–19% градиентном SDS-полиакриламидном геле по Лэммли. Использовали прибор MiniProtean 3 (Bio-Rad, США), источник питания – Эльф-4 («ДНК-Технология», Россия). В качестве белкового маркера использовали Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

«Нативный» полиакриламидный гель-электрофорез, разработанный Новаковским и соавт. [11], удалось адаптировать для эффективного разделения holo-Tf и apo-Tf (в модификации, представленной на интернет-странице BraunLab – [https://braunlab.de/?page\\_id=176](https://braunlab.de/?page_id=176)). Использовали 10% разделяющий и 4% концентрирующий гели. Образцы для анализа готовили, добавляя к ним ×4 буфер для нанесения, содержащий 400 мМ Трис-HCl, 600 мМ Трис-base, 0.075% Coomassie G-250, 0.025% бромфенол, 40% глицерина. Только маркер прогревали перед нанесением (в стандартном SDS-буфере по Лэммли). Электрофорез проводили при 150 В и охлаждении (+4°C). По окончании электрофореза гель отмывали в дистиллированной воде (3 раза по 5 мин), затем окрашивали белки в Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используя коммерчески доступные препараты трансферрина, нам удалось методом фагового дисплея отобрать из созданной нами ранее библиотеки кДНК-последовательностей нанотел [9] два заметно различающихся мажорных варианта высокоаффинных нанотел, которые обладали относительно разным сродством к holo-Tf и apo-Tf и, по-видимому,



**Таблица 1.** Определение констант связывания нанотел аTf-1 и аTf-2 с двумя формами трансферрина (holo-Tf и apo-Tf) в растворе при pH 7.4 с помощью микрокалориметра MicroCal PEAQ-ITC (Malvern)

Название нанотела	Связывание с holo-Tf*	Связывание с apo-Tf*
aTf1	$K_d1 \approx 0.44$ нМ; $K_d2 \approx 1.44$ нМ	$K_d1 \approx 99.4$ нМ; $K_d2$ не определилась
aTf2	$K_d1 \approx 0.94$ нМ; $K_d2 \approx 0.75$ нМ	$K_d1 \approx 0.82$ нМ; $K_d2 \approx 14.5$ нМ

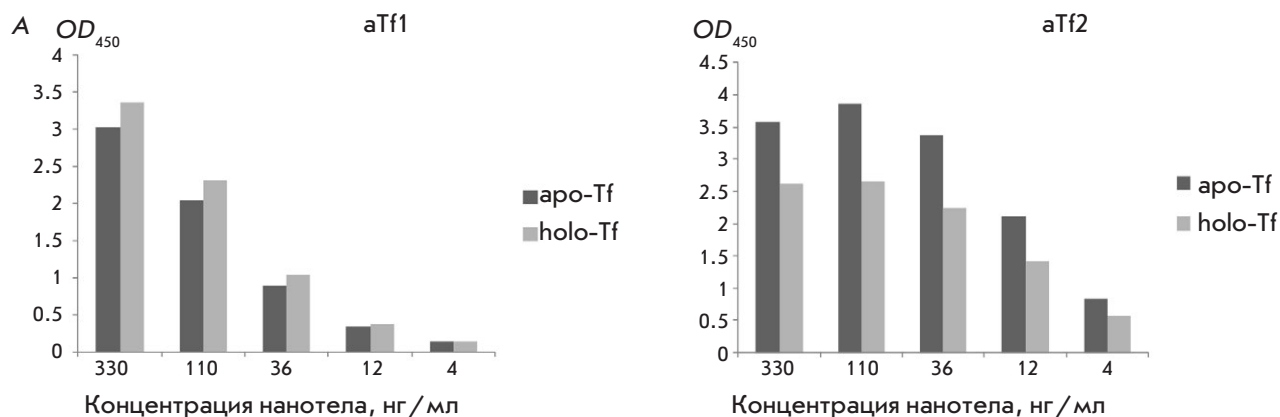
\*Модель подгонки: сайты последовательного связывания, количество сайтов – 2.

узнавали разные эпитопы трансферрина (рис. 1, табл. 1).

Если в ИФА разница в связывании разных форм трансферрина полученными нанотелами была лишь слабо заметна (рис. 1А), то в растворе (табл. 1) и в составе иммуносорбента (рис. 2А) эти нанотела работали неожиданно селективно. Нанотело аTf1 в растворе (PBS) при pH 7.4 с очень высокой аффинностью связывает holo-Tf и при этом в 100 раз

слабее связывает apo-Tf. Интересно, что сходным образом с трансферрином взаимодействует рецептор TfR1 [4]. Другое нанотело, аTf2, в растворе связывает обе формы трансферрина, но, по-видимому, особенно хорошо – apo-Tf. Последовательности этих двух нанотел сильно отличаются (рис. 1Б). В случае аTf2 значительно увеличен CDR3 и имеется, по-видимому, дополнительная Cys-Cys-связь между CDR1 и CDR3. Оба варианта нанотел были адаптированы, наработаны в периплазме бактерий и очищены как описано ранее [7–9]. Адаптированные нанотела были иммобилизованы на CNBr-сефарозе [8, 9], в результате чего получили два новых иммуносорбента. Проверена специфичность связывания этих иммуносорбентов с коммерческими препаратами трансферринов (apo- и holo-).

Мы адаптировали и успешно использовали специальный вариант электрофореза в полиакриламидном геле без SDS для разделения железосвязанного и железонесвязанного трансферринов (рис. 2А). К нашему удивлению, в колоночном формате нанотело аTf2 практически не связывает holo-Tf и очень эффективно связывает apo-Tf. Нанотело аTf1, напротив, очень хорошо связывает holo-Tf и заметно



**Б**

aTf1 MAQVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFSTYAMKWVRQAPGMGLEYYVASINNGGTSTFYASVKG  
 RFTISRDNKNTLYLQLNSLKTEDTAMYYCARINEYSTRGQGTQVTVSS

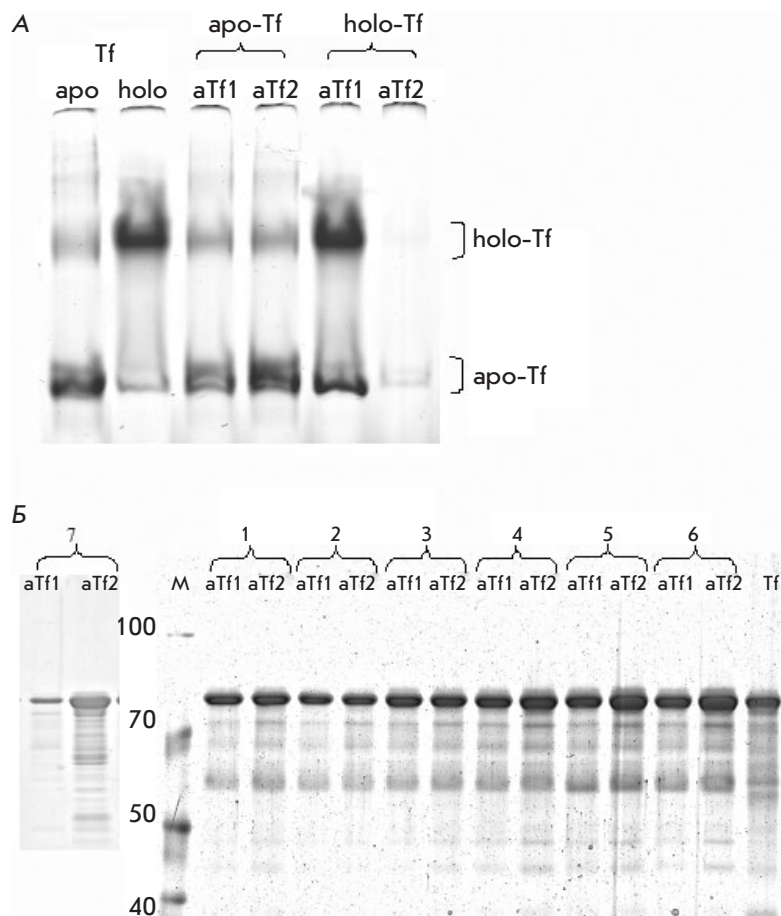
aTf2 MAQVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAVSGYMYSTNCMGWFRQAPGKEREGVAAIYTGGSSTYYPDSVKG  
 RFTISQDNKNTVYQLQMNSLKPEDTAMYYCAAMRHCPYGGNWDHPVNYLGQGTQVTVSS

**Рис. 1.** Характеристика двух новых нанотел против трансферрина человека. А – иммунофлуоресцентный анализ связывания нанотелами аTf1 и аTf2 в разных разведениях иммобилизованного в лунке иммунологического планшета апотрансферрина (темный столбик) или голотрансферрина (светлый столбик). Значения оптической плотности  $OD_{450}$  (ось Y) соответствуют количеству связанных нанотел, приведены средние значения дубликатов с вариациями менее 5% (вычтено среднее фоновое значение ~0.06 контрольных лунок). Б – аминокислотные последовательности, выведенные из определенных секвенированием кДНК-последовательностей, двух нанотел к трансферрину человека. Подчеркнуты гипервариабельные участки CDR1, CDR2 и CDR3. В CDR1 и CDR3 нанотела аTf2 выявляются остатки цистеина (выделены серым цветом)

слабее, чем aTf2, связывает очищенный препарат apo-Tf. Далее иммуносорбенты в колоночном формате параллельно использовали для тестирования потенциально возможных различий в относительной представленности связываемых форм трансферрина в норме и патологии. На рис. 2 представлены первые результаты такого тестирования. Можно видеть, что если в случае образцов плазмы крови здоровых доноров (образцы 1, 2 и 3) элюаты с обеих колонок содержат примерно равное количество трансферрина, то в случае образцов, полученных от онкологических больных (на продвинутых стадиях рака яичника, образцы 4–6), хорошо видно, что больше белка связывается, а затем элюируется в случае нанотел aTf2. Весьма похожая ситуация наблюдается при анализе трансферрина в моче больного с инвазивной формой рака мочевого пузыря (образец 7). У здоровых доноров содержание трансферрина в моче в десятки раз ниже, и, согласно нашим предварительным наблюдениям, мы не видим заметных различий в количествах трансферрина, связываемого иммуносорбентами. Таким образом, этот тест позволяет детектировать изменения в относитель-

ных количествах и доступности для связывания определенных эпитопов разных форм трансферрина с помощью нанотел, что потенциально может иметь диагностический потенциал, в том числе и для мониторинга онкологических заболеваний, но надежность и воспроизводимость предлагаемого теста нужно оценить на большем числе образцов.

Пока мы можем лишь предположить, что могут означать наблюдаемые эффекты. Иммуносорбент с нанотелом aTf2 позволяет селективно выделять apo-Tf. В норме это примерно 2/3 всего трансферрина, содержащегося в крови. Иммуносорбент с нанотелом aTf1 преимущественно связывает holo-Tf и часть (примерно половину) apo-Tf. Как результат, оба иммуносорбента связывают примерно 2/3 всего трансферрина плазмы крови (разного по составу). Известно, что раковые клетки особенно эффективно потребляют железо, что может приводить к дефициту железа в окружающих опухоль биологических жидкостях и относительному увеличению доли apo-Tf. С другой стороны, holo-Tf, в отличие от apo-Tf, очень эффективно связывается с рецептором TfR1 на поверхности клетки. Однако TfR1



**Рис. 2.** Специфичность связывания разных форм трансферрина нанотелами, пришитыми к сефарозе. А – использование гель-электрофореза в условиях, сохраняющих целостность комплекса трансферрина с ионами железа, для демонстрации селективного связывания разных форм трансферрина (apo-Tf и holo-Tf) иммобилизованными нанотелами (aTf1 или aTf2). На двух дорожках слева нанесены исходные трансферрины. Б – электрофоретическое фракционирование в 5–19% градиентном SDS-полиакриламидном геле белков крови (или мочи), связавшихся с иммуносорбентами в физиологических условиях и затем элюированных. Выявление количественных различий в представленности, по-видимому, разных по насыщению железом форм трансферрина (все формы трансферрина локализируются при данном электрофоретическом фракционировании в одной мажорной полосе) во фракциях трансферрина, выделенных параллельно с помощью двух иммуносорбентов, содержащих иммобилизованные нанотела aTf1 или aTf2, у здоровых доноров (образцы крови 1, 2 и 3) и у онкологических больных (стадия IV рака яичника – 4, 5, 6, или в моче больного мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря – 7). Обозначены размеры маркерных полос. Tf – трансферрин (коммерческий препарат – маркер)

выявляется и в свободном, внеклеточном виде (как растворимый sTfR1 [12]). Нельзя исключить, что при патологических процессах подобные взаимодействия holo-Tf–TfR1 могут экранировать часть holo-Tf от связывания с нанотелом aTf1. В совокупности, мы наблюдаем эффект заметного увеличения формы трансферрина, которую связывает нанотело aTf2, но не связывает или плохо связывает нанотело aTf1. Интерес представляет гипотеза, согласно которой связанное с экзосомами увеличение apo-Tf в биологической жидкости может быть следствием интенсивного потребления железа опухолевыми клетками.

В заключение отметим, что в данной работе нами получены новые однодоменные антитела и иммуносорбенты на их основе, которые по-разному связывают различающиеся по насыщенности железом формы трансферрина. Такая способность дифференциального связывания полученных иммуносорбентов позволяет наблюдать относительные изменения в представленности разных форм трансферрина, прямо или косвенно ассоциированные с онкологическими заболеваниями. ●

*Работа поддержана грантами РФФИ (№ 19-015-00487) и РНФ (№ 20-14-00305).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torti S.V., Torti F.M. // *Mol. Aspects Med.* 2020. V. 75. P. 100860.
2. Candelaria P.V., Leoh L.S., Penichet M.L., Daniels-Wells T.R. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 607692.
3. André M.N., Silva A.M.N., Moniz T., de Castro B., Rangel M. // *Coordination Chem. Rev.* 2021. V. 449. P. 214186.
4. Kleven M.D., Jue S., Enns C.A. // *Biochemistry.* 2018. V. 57. P. 1552–1559.
5. Yiannikourides A., Latunde-Dada G.O. // *Medicines (Basel).* 2019. V. 6. P. 85.
6. Elsayed M.E., Sharif M.U., Stack A.G. // *Adv. Clin. Chem.* 2016. V. 75. P. 71–97.
7. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. // *Acta Naturae.* 2010. Т. 2. С. 100–108.
8. Tillib S.V., Privezentseva M.E., Ivanova T.I., Vasilev L.F., Efimov G.A., Gurskiy Ya.G., Georgiev G.P., Goldman I.L., Sadchikova E.R. // *J. Chromatogr. B.* 2014. № 949–950. P. 48–57.
9. Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Рutowская М.В., Тиллиб С.В. // *Молекуляр. биология.* 2017. Т. 51. С. 985–996.
10. Тиллиб С.В. // *Молекуляр. биология.* 2020. Т. 54. № 3. С. 362–373.
11. Nowakowski A.B., Wobig W.J., Petering D.H. // *Metallomics.* 2014. V. 6. P. 1068–1078.
12. Speeckaert M., Speeckaert R., Delanghe J.R. // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2010. V. 47. № 5–6. P. 213–228.

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru):

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru)).

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком \*.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах:  $T_{\text{пл}}$  – температура плавления,  $T_{\text{ф.п}}$  – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.



- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не  $\mu\text{M}$ ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « $\times$ ». Знак « $\times$ » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « $\cdot$ » обозначаются комплексы соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегией определяется дальнейшая судьба рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте цифрами в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

*Для книг:* фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

*Для периодических изданий:* фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. Дис. ... канд. мед. наук. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

**Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.**