

УДК 612.822.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИ-EGFR АПТАМЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ GR20hh ДЛЯ РЕГУЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА В КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ПАЦИЕНТА

© 2024 г. Б. М. Иванов^{1, *}, О. М. Антипова¹, Я. А. Слиман^{2, 3}, Н. С. Самойленкова²,
И. Н. Пронин², Г. В. Павлова^{2, 4, 5}, А. М. Копылов¹

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

²ФГАУ "Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко"

Минздрава России, Москва, Россия

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

"ФБГУН" Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН", Москва, Россия

⁵ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России,
Москва, Россия

*e-mail: ivanovb661@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.10.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

В данной статье представлено исследование возможности регулируемой доставки доксорубина (ДОКС) в клетки глиобластомы (ГБ) в составе нековалентной конструкции с ДНК-аптамером, специфичным к EGFR, путем интеркаляции в искусственно созданный дуплекс. Конструкция представляла собой ранее описанный ДНК-аптамер GR20 (46 нуклеотидов), удлинённый на 18 нуклеотидов с 3'-конца (GR20h), который гибридизовали с комплементарным ДНК-олигонуклеотидом (h). Сборка дуплекса происходит эффективно, полученная конструкция GR20hh стабильна при 37 °С, T_{пл} = 59 °С. В конструкцию интеркалирован ДОКС. С помощью метода xCelligence, с оригинальной обработкой данных, обнаружено, что при добавлении в культуру клеток ДОКС, в составе нековалентной конструкции GR20hh-ДОКС, сохраняет цитотоксические свойства, однако кинетика действия комплекса на клетки ГБ оказалась принципиально отличной от действия чистого ДОКСа. Уникальный подход и полученные с его помощью данные открывают возможности для регулирования цитотоксической активности ДОКС и разработки методов направленного действия на клетки-мишени ГБ.

Ключевые слова: доксорубин, глиобластома, аптамер, таргетная доставка

DOI: 10.31857/S0044467724010107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДОКС	— доксорубин
ГБ	— глиобластома
Ат	— антитела
ВЭЖХ	— высокоэффективная жидкостная хроматография
EGFR	— рецептор эпидермального фактора роста (англ. epidermal growth factor receptor)

ВВЕДЕНИЕ

Стандартная терапия глиобластомы (ГБ) состоит в хирургическом вмешательстве, облучении и химиотерапии, однако эффективность последней часто ограничена в связи с низкой селективностью и высокой токсичностью применяемых противоопухолевых препаратов. Регулируемая и таргетная доставка цитотоксического агента к клеткам опухоли позволяет снизить негативное воздействие на клетки

нормы, тем самым снижая нежелательные побочные эффекты. Доксорубин (ДОКС) — известный представитель антрациклиновых противоопухолевых терапевтических препаратов, который применяется в медицине (Martins-Teixeira et al., 2020). Противоопухолевая активность антрациклиновых препаратов основана на их способности эффективно ингибировать синтез нуклеиновых кислот в клетке, что обусловлено рядом механизмов, в том числе интеркаляцией в двуцепочечную ДНК клетки и по-

следующим блокированием топоизомеразы II (Minotti et al., 2004). Действие ДОКСа не специфично, поэтому его токсичность для нормальных клеток высока (Pugazhendhi et al., 2018). Возможным решением этой проблемы является регуляция активности ДОКСа и нацеливание его на клетки глиобластомы (ГБ) с помощью таргетирующего агента.

В качестве нацеливающего агента традиционно используют антитела (Ат). Одним из способов селективной доставки ДОКСа является создание ковалентных конъюгатов противоопухолевого препарата с векторными молекулами (ADC, antibody-drug conjugate), такими как Ат и пептиды (Ai et al., 2018; Akhtar et al., 2022). Однако при конъюгации ДОКСа происходит химическая модификация, что снижает его противоопухолевую активность.

Способность ДОКСа интеркалировать в двойную спираль ДНК позволяет осуществить доставку ДОКСа в клетки с использованием нековалентного комплекса ДОКСа и двуцепочечным фрагментом ДНК. Успешное применение комплекса ДОКСа с двуцепочечной ДНК, конъюгированной с Ат, для направленной доставки ДОКСа было описано (Liu et al., 2019).

В настоящей работе в качестве потенциально таргетирующего агента использовали ДНК-аптамер к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) – GR20 (Zavyalova et al., 2020). EGFR является значимым молекулярным маркером ГБ и, соответственно, может быть использован в качестве мишени для направленной доставки ДОКСа к клеткам ГБ (Horbinski et al., 2021). Конструкцию GR20hh получали путем гибридизации олигодезоксирибонуклеотида h с комплементарным ему 3'-концевым одноцепочечным участком аптамера GR20h и затем использовали ее для связывания ДОКСа путем интеркаляции в полученный двуцепочечный участок.

Целью настоящей работы было исследование возможности использования конструкции на базе аптамера GR20 для доставки токсического агента – ДОКСа, в клетки ГБ. Было необходимо получить ответы на следующие вопросы: как собрать нековалентную конструкцию аптамера с дополнительным двутяжевым участком ДНК; насколько конструкция стабильна в клеточных тестах; сохраняется ли активность аптамера GR20 в конструкции GR20hh; насколько эффективна интеркаляция ДОКСа в двуцепочечный участок

конструкции; действует ли комплекс GR20hh-ДОКС на клетки ГБ и отличается ли кинетика действия от кинетики для самого ДОКСа?

МЕТОДИКА

Олигонуклеотиды и реактивы. Нуклеотидные последовательности ДНК-аптамера GR20, ДНК-аптамера GR20h с 3'-концевым одноцепочечным дополнительным участком и комплементарного олигонуклеотида h приведены в табл. 1.

Таблица 1. Используемые в работе олигонуклеотиды
Table 1. Oligonucleotides used in the research

Шифр	Длина, нт	Нуклеотидная последовательность, 5' – 3'
ah	18	TTGTGTTGGTCCTAAATG
h	18	CATTTAGGACCAACACAA
GR20	46	ACGCACCATTGTTTAAATATGTTTT TTAATTCCTTGTGGTGTGT
GR20h	64	ACGCACCATTGTTTAAATATGTTTT TTAATTCCTTGTGGTGTGTGCATT TAGGACCAACACAA

Получение комплекса аптамера GR20hh или дуплекса ahh. Удлиненный аптамер GR20h и комплементарный олигонуклеотид h смешивали в одинаковой концентрации в буфере Tris-HCl pH = 7.4 с добавлением 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂ и преформировали: раствор нагревали течение 5 мин при температуре 95 °C, после чего медленно охлаждали до комнатной температуры. Аналогично дуплекс ahh получали смешением двух олигонуклеотидов: ah и комплементарного ему h.

УФ-спектроскопия. Спектрофотометрические кривые плавления образцов олигонуклеотидов регистрировали в кювете с длиной оптического пути 10 мм с помощью УФ-спектрофотометра Hitachi U-2900 (Hitachi, Япония), оснащенной термоэлектрическим контроллером SPR-10. Данные собирали в интервале температур от 20 до 90 °C при длине волны 260 нм. Скорость нагрева составляла 0.5 °C/мин.

Эксклюзионная ВЭЖХ. Эксклюзионную ВЭЖХ проводили на ВЭЖХ-системе Agilent 1200 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) при температуре 25 °C и скорости потока 0.5 мл/мин, на хроматографической колонке TSKgel G2000SWXL длиной 30 см, диаметр частиц 5 мкм, средний диаметр пор 12.5 нм (Tosoh Bioscience, South San Francisco, CA, USA). Подвижная фаза состояла из калийно-фосфатного буфера (60 mM K₂HPO₄

и 140 мМ K_2HPO_4 , рН 6.85) и ацетонитрила в соотношении 9:1 об/об. Детектировали поглощение при 260 нм. Калибровку колонки и эксперименты проводили, как описано ранее (Zavyalova et al., 2019), (Alieva et al., 2019).

Интерферометрия биослоев. Концентрация комплекса аптамера biotin-GR20hh в буфере Tris-HCl составляла 2 мкМ. Рекомбинантный внеклеточный домен человеческого EGFR компании Cloud-Clone Corp. (США) растворяли в охлажденном фосфатном буферном растворе, концентрация стокового раствора составляла 0.1 мг/мл. Образцы белка готовили путем последовательного разбавления стокового раствора в фосфатном буферном растворе до концентраций: 12 нМ, 2.5 нМ, 0.5 нМ, 0.1 нМ. Для регенерации сенсоров использовался 1 М раствор этаноламина гидрохлорида рН 8.5, и на стадии отмывки использовали фосфатный буферный раствор. Для проведения измерений использовали биосенсоры с иммобилизованным стрептавидином, SA (ForteBio, США). Иммобилизацию осуществляли за счет использования меченого биотином по 5'-концу олигонуклеотида h. Экспериментальное исследование выполнялось на приборе Sartorius Octet R2 (Германия). Обработку сенсограмм проводили с помощью программы Origin 2021 (OriginLab, США) в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1:1.

Флуориметрическое титрование. Спектрофлуориметрическое титрование проводили на приборе Varian Cary BIO 50 UV/VIS/NIR (Agilent Technologies Inc., США). Спектры поглощения измерялись в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Длина волны возбуждения λ_{ex} — 480 нм; диапазон длин волн испускания λ_{em} 520–750 нм с шагом в 1 нм.

В буферный раствор Tris-HCl, содержащий фиксированную концентрацию ДОКСа ($C_{ДОКС} = 1$ мкМ), последовательно добавляли по 1–5 мкл стокового раствора исследуемого олигонуклеотида или комплекса олигонуклеотида, раствор перемешивали и выдерживали в течение минуты для установления равновесия, а затем регистрировали спектр флуоресценции. Измерения повторяли 3 раза. Перед экспериментом регистрировали базовую линию флуоресценции буферного раствора. Базовая линия автоматически вычиталась программным обеспечением прибора. Измеренные спектры флуоресценции усредняли, расчеты вели по усредненным данным.

Получение комплекса GR20hh+ДОКС. К охлажденному раствору комплекса GR20hh добавляли эквимольное количество ДОКСа, тщательно перемешивали, выдерживали не менее 30 мин при комнатной температуре, после чего полученный раствор использовали для тестирования жизнеспособности клеток.

Культивация клеток. Клетки культуры Sus/fp2, выделенные из опухолевой ткани глиобластомы пациента, для проведения исследования любезно предоставлены лабораторией молекулярно-клеточной нейрогенетики ФГАУ «НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. Клетки, используемые в эксперименте, культивировали в ростовой среде DMEM/F12 с пируватом натрия с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% раствора NEPES для поддержания рН, 1% GlutaMAX и 1% антибиотика стрептомицина в среде 5% CO_2 при 37°C.

Исследование выживаемости клеток. Исследование жизнеспособности проводили с помощью клеточного анализатора xCelligence S16 (Agilent Technologies, США). Исходный уровень сопротивления измеряли, поместив в прибор планшет с заполненными средой лунками. Клетки Sus/fp2 рассеивали на лунки по 7000 в объеме 200 мкл. Далее планшет помещали в анализатор и регистрировали сопротивление лунок планшета. Через 24 ч регистрацию останавливали, к клеткам добавляли исследуемые вещества: ДОКС в концентрациях 1 мкМ и 0.05 мкМ, комплекс ДОКСа с аптамером GR20hh—ДОКС в концентрации 1 мкМ (соотношение аптамер:ДОКС в комплексе — 1:1), в контрольные лунки вносили аналогичный объем фосфатно-солевого буфера, после чего возвращали планшет в прибор, и в режиме реального времени регистрировали сопротивление в лунках еще в течение 100 ч. Полученные данные обрабатывали с помощью ПО Origin 2021 (OriginLab, США). Полученные кривые выживаемости сглаживали, затем дифференцировали по времени для получения графиков изменения скорости роста/гибели клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Спектрофотометрический анализ плавления олигонуклеотидов при 260 нм использовали для верификации образования дуплексов ДНК. На кривых плавления дуплекса в 18 пар нуклеотидов ahh наблюдается перегиб (рис. 1 (а)), соответствующий плавлению дуплекса. Обнаружить образование двуцепочечных участков в структу-

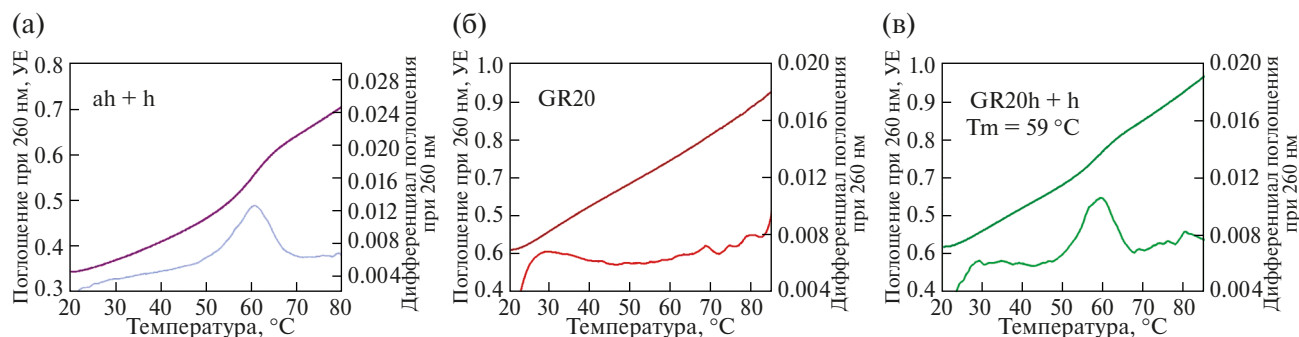


Рис. 1. Спектрофотометрическое плавление двуцепочечного дуплекса ahh (а), аптамера GR20 (б) и конструкции удлиненного аптамера GR20h с комплементарным олигонуклеотидом h (в). На каждом графике приведены собственно кривые плавления при 260 нм и их дифференциальный вид (снизу).

Fig. 1. Spectrophotometric melting of the double-stranded duplex ahh (a), the GR20 aptamer (б), and the construct of the extended GR20h aptamer hybridized with complementary oligonucleotide h (в). Each graph shows the melting curves at 260 nm and their differential appearance (bottom).

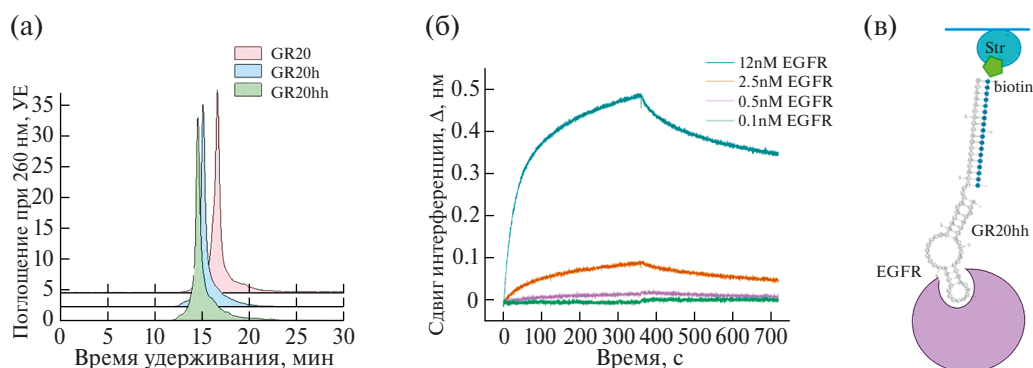


Рис. 2. Хроматограммы разделения аптамера GR20 (красная), его удлиненного варианта GR20h (голубая) и нековалентной конструкции GR20hh (зеленая) (а). Сенсограммы связывания иммобилизованной конструкции GR20hh с рекомбинантным внеклеточным доменом белка EGFR (б). Схема образования ДНК-белкового комплекса, иллюстрирующего предыдущий пункт (в).

Fig. 2. Chromatogram of the GR20 aptamer (red line), its extended variant GR20h (blue line), and the construction of the extended GR20h aptamer hybridized with its complementary oligonucleotide h (green line) (a) – Sensograms of binding of the construction GR20hh with the recombinant EGFR protein (б). Scheme of interaction of immobilized aptamer construction GR20hh with protein EGFR (в).

ре исходного аптамера GR20 с помощью плавления затруднительно (рис. 1 (б)). Кривая плавления нековалентной конструкции GR20hh соответствовала суперпозиции кривых плавления отдельных элементов – аптамера GR20 и дуплексного модуля (рис. 1 (в)) с $T_{пл} = 59^\circ\text{C}$.

Прямое доказательство образования конструкции GR20hh получали с помощью оригинального варианта метода эксклюзионной ВЭЖХ (Zavyalova et al., 2019; Alieva et al., 2019). При проведении ВЭЖХ для конструкции GR20hh на хроматограмме наблюдается единственный пик, смещенный в область более низких времен удерживания относительно пика исходного аптамера GR20 и удлиненного варианта аптамера GR20h (рис. 2(а)).

Кинетику взаимодействия иммобилизованного GR20h с рекомбинантным внеклеточным доменом рецептора EGFR изучали методом интерферометрии биослоев. Комплементарный олигонуклеотид h с биотиновой меткой на 5'-конце иммобилизовали на поверхность стрептавидинового сенсора и добавляли GR20h, чтобы собрать конструкцию GR20hh (рис. 2 (б, в)).

За включением ДОКСа в двуцепочечный участок конструкции GR20hh наблюдали при тушении флуоресценции ДОКСа. Спектры флуоресценции, полученные в ходе титрования ДОКСа исходным аптамером GR20 и конструкцией GR20hh, приведены на рис. 3 (а, б). ДОКС обладает максимумом эмиссии флуоресценции при длине волны 590 нм, при добавлении аптамера

или конструкции наблюдалось снижение интенсивности максимума флуоресценции.

Значения максимумов флуоресценции при 590 нм пересчитывали в относительные значения связанного ДОКСа, принимая значение максимума флуоресценции для чистого ДОКСа за единицу, наносили на график зависимости относительной интенсивности флуоресценции от соотношения концентрации аптамера и ДОКСа в растворе (рис. 3 (в)). Согласно графикам, уже при соотношении 0.5:1 GR20hh по отношению к ДОКСу значение падения флуоресценции выходит на плато.

Для 1 мкМ концентрации исходного аптамера GR20 и ДОКСа около 75% ДОКСа интерка-

лировано, в то время как конструкция GR20hh связывает в комплекс 95% ДОКСа. Именно эту концентрацию использовали для тестирования регулируемой доставки ДОКСа в клетки ГБ.

Изучение эффективности доставки ДОКСа в составе конструкции GR20hh в клетки ГБ проводили с использованием уникального современного метода xCelligence — определения жизнеспособности клеток по изменению проводимости подложки адгезивных клеток. Так как метод измерения клеточного индекса xCelligence еще достаточно новый, то универсальный подход, позволяющий интерпретировать получаемые данные в полном объеме, еще не разработан. Программное обеспечение прибора, предоставленное производителем, позволяет рассчитывать

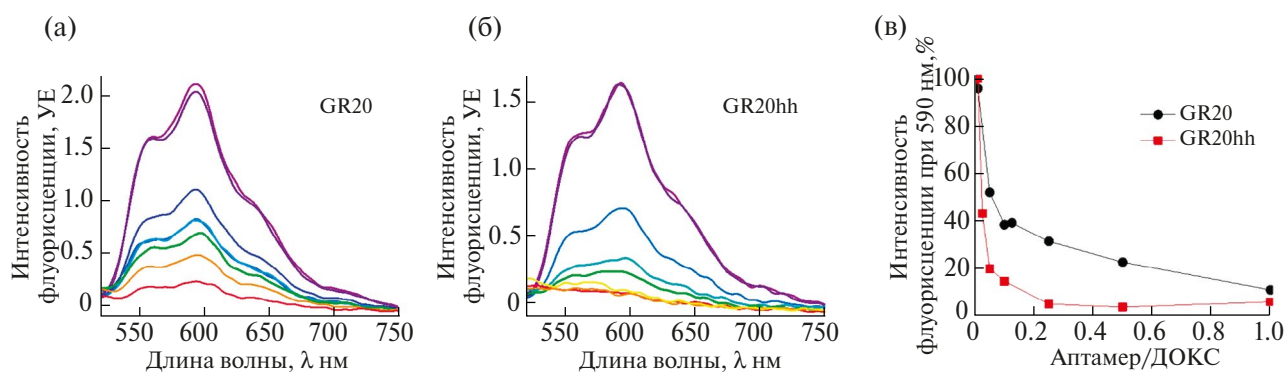


Рис. 3. Спектры эмиссии флуоресценции раствора ДОКСа ($C_{\text{ДОКС}} = 1 \text{ мкМ}$) при добавлении GR20 (а) и конструкции GR20hh (б). Зависимость интенсивности максимума флуоресценции ДОКСа от соотношения концентраций олигонуклеотида и ДОКСа (в).

Fig. 3. Fluorescence emission spectra of DOX ($C_{\text{DOX}} = 1 \text{ μМ}$) solution upon addition of the GR20 (а) and GR20hh construction (б). Dependence of the intensity of the DOX fluorescence maximum on the ratio of the concentrations of the oligonucleotide and DOX (в).

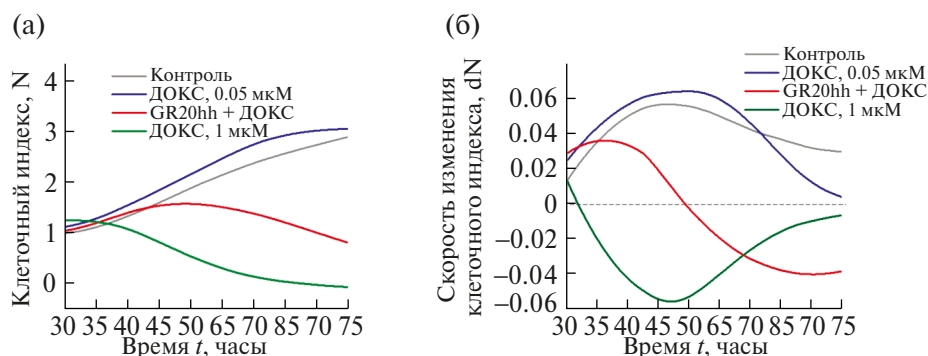


Рис. 4. Изменение клеточного индекса для клеток перевиваемой клеточной культуры ГБ Sus/fP2 при воздействии ДОКСа в концентрациях 0.05 мкМ и 1 мкМ (голубая и синяя линии) и ДОКСа, интеркалированного в конструкцию GR20hh (оранжевая линия); интактные клетки Sus/fP2 без обработки (серая линия). Данные в стандартном представлении (а), данные в виде оригинальных дифференциальных кривых, отражающих скорость роста/гибели клеток (б).

Fig. 4. Cellular index alteration for cells of the continuous GB cell culture Sus/fP2 when cells were exposed to DOX at concentrations of 0.05 μM and 1 μM (blue and blue lines) and DOX intercalated into the GR20hh complex (orange line): intact Sus/fP2 cells without exposure (gray line). Data in classical representation (а) and the same data in differentiated form, representing the rate of cell growth/death (б).

временной показатель удвоения популяции клеток и отражает итог воздействия в целом только для конкретного рассматриваемого промежутка времени.

Предлагаемый нами новый подход анализа дифференциальных кривых клеточного индекса позволяет перейти к рассмотрению процесса цитотоксического воздействия в динамике. Дифференцирование кривых клеточного индекса позволяет получить новые параметры для описания пролиферативных процессов — скорости роста или гибели клеток (рис. 4).

Внесение образцов препаратов в клеточный адгезионный слой в приборе изменяет адгезию клеток, поэтому обсчет данных проводили начиная с 30 ч ведения эксперимента, после того как состояние клеток стабилизировалось. Кривые выживаемости клеток, полученные для ДОКСа в контрольной концентрации 0.05 мкМ (остаточная концентрация ДОКСа, не связанного с конструкцией), существенно не отличаются от кривых, полученных для буферного раствора. В обоих случаях значения производной клеточного индекса оставались положительными, что говорит об отсутствии токсичности. Добавление к клеткам ДОКСа в рабочей концентрации 1 мкМ приводит к полной гибели клеток в течение двух суток после его добавления, при этом значение производной клеточного индекса падало ниже нуля уже через 8 ч после добавления ДОКСа (на 32-й ч эксперимента) и на протяжении всего эксперимента оставалось отрицательным, что говорит о гибели клеток. Минимум значения производной клеточного индекса наблюдался через 23 ч после добавления ДОКСа. Затем скорость гибели клеток постепенно снижалась. Добавление ДОКСа, интеркалирован-

ного в конструкцию GR20hh, также приводит к гибели клеток, однако производная клеточного индекса опускается ниже нуля только через 25 ч (против 8 ч) после добавления интеркалированного ДОКСа, а минимум значения производной был достигнут только через 46 ч после добавления (против 23 ч). Это говорит об отложенном действии ДОКСа, интеркалированного в конструкцию.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Образование нековалентной конструкции, состоящей из удлиненной версии аптамера GR20h и его комплемента h, анализировали с помощью оригинального метода эксклюзионной ВЭЖХ, образование дуплекса происходит с количественным выходом. Тпл конструкции GR20hh составляла 59 °С, что значительно превосходит температурные диапазоны его применения в биомедицинских исследованиях.

С помощью метода интерферометрии биослоев было показано, что конструкция GR20hh способна связываться с мишенью исходного аптамера GR20 — с рецептором EGFR без потери аффинности в наномолярном диапазоне.

Эффективность интеркаляции ДОКСа в дуплетный участок конструкции GR20hh определяли с помощью флуоресцентного титрования. ДОКС интеркалирует между комплементарными парами азотистых оснований (Pérez-Arnaiz et al., 2014). Возможные вторичные структуры аптамера GR20 и конструкции GR20hh приведены на рис. 5 (Zavyalova et al., 2020). В предполагаемой структуре аптамера GR20 имеется два двутяжевых участка с суммарной длиной в 11 нуклеотидов, в то время как дополнительный двутяжевой участок имеет длину 18 нуклеоти-

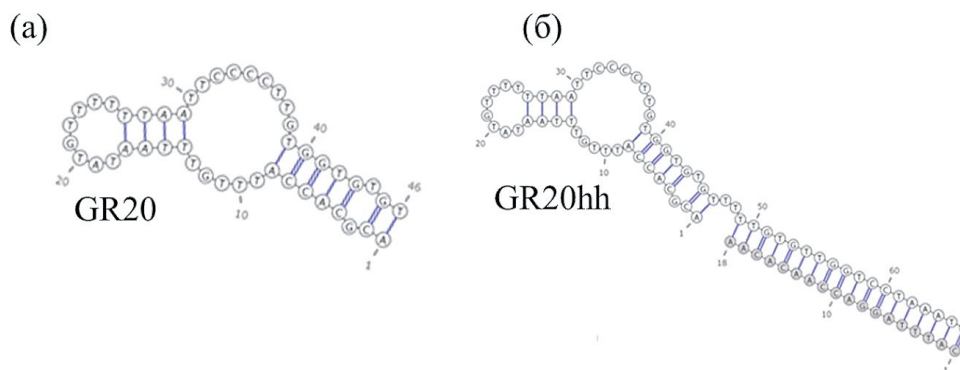


Рис. 5. Возможная вторичная структура аптамера GR20 (а) и конструкции GR20hh (б).
Fig. 5. Possible secondary structure of aptamer GR20 (a) and GR20hh construction (b).

дов. Увеличение кривизны кривой связывания для GR20hh говорит о том, что дополнительный двутяжевой участок обеспечивает основное, более эффективное связывание ДОКСа, при этом концентрация свободного ДОКСа не превышала 5% от исходной. Различие в эффективности связывания ДОКСа с аптамером GR20 и с конструкцией GR20hh обусловлено разным количеством центров связывания и разной природой. Таким образом, за счет формирования дополнительного дуплекса в нековалентной конструкции GR20hh удалось увеличить эффективность связывания ДОКСа.

Впервые для измерения непрерывной кинетики цитотоксического действия ДОКСа на клетки использован метод измерения электрической проводимости адгезионной культуры клеток — xCelligence в реальном времени.

Впервые предложен метод обчета данных, который позволяет оценивать результат выживаемости клеток не в конкретной точке, по достижении какого-то конкретного момента времени, а в динамике, в реальном времени — на всем протяжении времени проведения эксперимента. Оригинальный разработанный метод применили для обчета результатов экспериментов по изучению цитотоксического действия ДОКСа, интеркалированного в конструкцию GR20hh, на перевиваемую культуру клеток ГБ человека Sus/fP2.

Клетки перевиваемой культуры ГБ человека Sus/fP2 по-разному реагируют на действие свободного ДОКСа и комплекса GR20hh-ДОКС.

При добавлении 1 мкМ ДОКСа к клеткам наблюдается продолжение роста клеточного индекса в течение 8 ч (рис. 4 (б)). Затем значение производной клеточного индекса становится отрицательным, что отражает начало гибели клеток. Затем скорость гибели клеток увеличивается, что можно объяснить накоплением ДОКСа в клетках. Через 23 ч после добавления ДОКСа наблюдается снижение скорости гибели клеток, что, скорее, связано с уменьшением общего количества живых клеток.

При добавлении комплекса GR20hh-ДОКС в течение 25 ч наблюдается постепенное замедление роста клеток, после чего клеточный индекс начинает уменьшаться. Концентрация ДОКСа 5% от исходной не является цитотоксичной, жизнеспособность клеток не изменяется.

Отсюда следует, что при добавлении к клеткам нековалентного комплекса GR20hh-ДОКС мы наблюдаем действие именно ДОКСа, интеркалированного в конструкцию, а не остаточного свободного ДОКСа вне конструкции.

Если ДОКС в низкой концентрации практически не токсичен, то при добавлении ДОКСа в концентрации 1 мкМ наблюдается гибель клеток. ДОКС в составе комплекса GR20hh-ДОКС сохраняет активность, уже через двое суток воздействия клетки практически полностью погибают (рис. 4). Однако характер действия комплекса GR20hh-ДОКС на клетки ГБ Sus/fP2 оказался принципиально отличным от действия свободного ДОКСа: предложенный нами метод обчета данных xCelligence позволил выявить временной лаг в действии комплекса относительно действия свободного ДОКСа. Такое поведение комплекса объяснимо, если предположить иной механизм проникновения в клетки ГБ Sus/fP2 комплекса GR20hh-ДОКС, по сравнению с чистым ДОКСом. Таким образом, показана возможность изменять кинетику цитотоксического действия ДОКСа на клетки ГБ. Приводит ли это к изменению механизма гибели клеток и уменьшению общей токсичности ДОКСа, еще предстоит выяснить.

ВЫВОДЫ

В данной работе впервые создана и охарактеризована система для регулируемой доставки противоопухолевого цитотоксического агента — ДОКСа, которая представляет собой аптамер к опухолевому биомаркеру EGFR — GR20 с дополнительным двучепочным участком для более эффективного связывания ДОКСа. Действие комплекса GR20hh-ДОКС было протестировано на опухолевых клетках перевиваемой культуры глиобластомы Sus/fP2, полученной из постоперационного образца опухоли пациента. Тестирование проводили методом измерения жизнеспособности клеток по проводимости поверхности, на которой растут прикрепленные клетки, на приборе xCelligence. В свободном виде ДОКС начинает действовать на клетки Sus/fP2 сразу, проникая через мембрану опухолевых клеток путем свободной диффузии. Цитотоксическое действие ДОКСа в комплексе с нековалентной конструкцией сохраняется, однако кинетика действия свободного ДОКСа и ДОКСа, интеркалированного в конструкцию GR20hh, раз-

личается кардинально: наблюдается запаздывание действия комплекса GR20hh-ДОКС на жизнеспособность клеток. Детально механизм попадания ДОКСа в комплексе с нековалентной конструкцией в клетку не исследовался. Можно предположить, что различие в кинетике происходит вследствие ряда причин: иной механизм проникновения конструкции в клетку, медленное высвобождение конструкции из эндосом и медленное высвобождение ДОКСа из конструкции.

В настоящей работе показано сохранение токсичности доксорубина, интеркалированного в двойную спираль ДНК. Полученные данные служат основой для создания других нековалентных конструкций. Например, для направленного токсического действия на определенный тип клеток-мишеней за счет дизайна узнающего участка аптамерной конструкции.

Предложенный новый подход для дифференцирования и интерпретации данных xCelligence позволяет изучать кинетику действия многих токсических агентов на адгезионные культуры клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Ташлицкого В. Н. за помощь в постановке экспериментов эксклюзивной ВЭЖХ и Кубареву Е. А. за содействие при проведении УФ-спектрофотометрического плавления олигонуклеотидов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению № 075–15–2021–1343 от 4 октября 2021 г.

Заявление об информированном согласии: пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследованиях. Исследования были одобрены локальным комитетом по этике Центра нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ai S., Duan J., Liu X., Bock S., Tian Y., Huang Z. Biological evaluation of a novel doxorubicin – peptide conjugate for targeted delivery to EGF receptor-overexpressing tumor cells. *Mol. Pharm.* 2011. 8 (2): 375–386.
- Akhtar N., Mohammed H. A., Yusuf M., Al-Subaiyel A., Sulaiman G. M., Khan R. A. SPIONs conjugate supported anticancer drug doxorubicin's delivery: current status, challenges, and prospects. *Nanomaterials*. 2022. 12 (20): 3686.
- Aliieva R. R., Zavyalova E. G., Tashlitsky V. N., Kopylov A. M. Quantitative characterization of oligomeric state of G-quadruplex antithrombin aptamers by size exclusion HPLC. *Mendeleev Communications*. 2019. 29 (4): 424–425.
- Horbinski C., Berger T., Packer R. J., Wen, P. Y. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. *Nat. Rev. Neurol.* 2022. 18 (9): 515–529.
- Kopylov A. M., Fab L. V., Antipova O., Savchenko E. A., Revishchin A. V., Parshina V. V., Pavlova S. V., Kireev I. I., Golovin A. V., Usachev D. Y., Pavlova G. V. RNA aptamers for theranostics of glioblastoma of human brain. *Biochemistry (Moscow)*. 2021. 86: 1012–1024.
- Liu T., Song P., Märcher A., Kjems J., Yang C., Gothelf K. V. Selective delivery of doxorubicin to EGFR+ cancer cells by Cetuximab–DNA conjugates. *Chem. Bio. Chem.* 2019. 20 (8): 1014–1018.
- Martins-Teixeira M. B., Carvalho I. Antitumour anthracyclines: progress and perspectives. *Chem. Med. Chem.* 2020. 15 (11): 933–948.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2004. 56 (2): 185–229.
- Pérez-Arnaiz C., Busto N., Leal J. M., García B. New insights into the mechanism of the DNA/doxorubicin interaction. *J. Phys. Chem B*. 2014. 118 (5): 1288–1295.
- Pugazhendhi A., Edison T. N. J. I., Velmurugan B. K., Jacob J. A., Karuppusamy I. Toxicity of doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci.* 2018. 200: 26–30.
- Zavyalova E. G., Legatova V. A., Aliieva R. S., Zalevsky A. O., Tashlitsky V. N., Arutyunyan A. M., Kopylov A. M. Putative mechanisms underlying high inhibitory activities of bimodular DNA aptamers to thrombin. *Biomolecules*. 2019. 9 (2): 41.
- Zavyalova E., Turashev A., Novoseltseva A., Legatova V., Antipova O., Savchenko E., Balk S., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A. Pyrene-modified DNA aptamers with high affinity to wild-type EGFR and EGFRvIII. *Nucl. Acid Therap.* 2020. 30 (3): 175–187.

ANTI-EGFR APTAMERIC CONSTRUCT GR20HH FOR CONTROLLABLE DELIVERY OF DOXORUBICIN INTO GLIOBLASTOMA CELLS

**B. M. Ivanov^{a, #}, O. M. Antipova^a, Y. A. Sliman^{b, c}, N. S. Samoylenkova^b, I. N. Pronin^b,
G. V. Pavlova^{b, d, e}, A. M. Kopylov^a**

^a*Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia*

^b*Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia*

^c*Moscow institute of physics and technology, national research university, Dolgoprudny, Russia*

^d*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^e*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: ivanovb661@yandex.ru*

This publication describes research on a possibility of controllable delivery of doxorubicin (DOX) into glioblastoma (GB) cells, being inside non-covalent construct with anti-EGFR DNA aptamer by intercalating into artificially created duplex. The construct has been made with previously described DNA aptamer GR20 (46 nucleotides), with 3'-end 18 nucleotides extension (GR20h), which was hybridized with the complementary DNA oligonucleotides (h). The duplex assembly is effective, the construct GR20hh is stable at 37 °C, T_m = 59 °C. DOX is intercalated into the construct. By applying xCelligence Real-Time Cell Analysis (RTCA) combined with self-created data processing, it has been shown that during a treatment of cell culture DOX, inside the non-covalent construct GR20hh – DOX, saves cytotoxic ability, though a kinetics of toxic action of the complex on GB cells is completely different from the kinetics of DOX along.

The unique approach and the data are the bases for a development of both a regulation and a targeting of DOX cytotoxic activity toward specific GB cells.

Keywords: doxorubicin, glioblastoma, aptamer, targeted delivery