

УДК 577.112.7;577.113.7;577.22

КОМПЛЕКСЫ И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АССОЦИАТЫ ДОДЕЦИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

© 2023 А.С. Павлова*, В.В. Илющенко, М.С. Купрюшкин, Т.Д. Жарков, Е.С. Дюдеева,
И.А. Бауэр, А.С. Чубаров, Д.В. Пышный, И.А. Пышная*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: pyshnaya@niboch.nsc.ru, pavlova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 26.04.2023

После доработки 26.06.2023

Принята к публикации 04.07.2023

Сывороточный альбумин, имеющий в своей молекуле несколько сайтов связывания различных соединений, в том числе липофильных олигонуклеотидных производных, является объектом биомедицинских исследований как перспективная платформа для создания многокомпонентных самоорганизующихся систем. В данной работе мы исследовали методом задержки в геле стехиометрию связывания бычьего сывороточного альбумина и сывороточного альбумина человека с додецил-содержащими олигонуклеотидами. Результаты исследования свидетельствуют об образовании в условиях, близких к физиологическим, комплексов со стехиометрией альбумин : олигонуклеотидное производное, равной 1 : (1,25 ± 0,25). Методом атомно-силовой микроскопии показано, что результатом взаимодействия сывороточного альбумина человека с дуплексом комплементарных додецил-содержащих олигонуклеотидов являются высокомолекулярные ассоциаты округлой формы диаметром 165,5 ± 94,3 нм и высотой 28,9 ± 16,9 нм, а с комплексами полиадениловой кислоты и додецил-содержащего олиготимидилата — супрамолекулярные ассоциаты размером 315,4 ± 70,9 и 188,3 ± 43,7 нм. Полученные данные позволяют рассматривать додецил-содержащие олигонуклеотиды и альбумин как перспективные составляющие для разработки самоорганизующихся систем для решения задач молекулярной биологии и биомедицины, в частности, создания уникальных тераностиков направленного действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сывороточный альбумин, додецил-содержащие олигонуклеотиды, белково-нуклеиновые комплексы, самоорганизация биополимеров, супрамолекулярные ассоциаты, доставка нуклеиновых кислот.

DOI: 10.31857/S0320972523080109, EDN: IKOTTQ

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтические нуклеиновые кислоты (тНК), их синтетические аналоги и наноконструкции на их основе являются в настоящее время объектами исследований для решения различных задач в областях персонализированной медицины и тераностики [1–4]. Восемнадцать лекарственных препаратов на основе тНК получили разрешение на применение в терапии различных заболеваний человека и более 100 находятся на разных этапах доклинических испытаний [3, 5–7]. Одним из важных

факторов, сдерживающих потенциал применения тНК *in vivo*, является проблема их направленной доставки к внутриклеточным мишеням [1–2]. Помимо этого, существуют другие сложности в применении тНК, связанные с такими аспектами, как быстрая деградация тНК под действием внеклеточных и внутриклеточных ферментов, выведение тНК из организма, плохая способность тНК к преодолению барьеров ретикулоэндотелиальной системы, низкая эффективность проникновения тНК внутрь клеток и выхода из эндосом [3, 8–10]. Имеющиеся достижения в области разработки

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия; БСА — бычий сывороточный альбумин; ДСО — додецил-содержащий олигонуклеотид; ЖК — жирные кислоты; НК — нуклеиновые кислоты; тНК — терапевтические НК; поли(dA) — полиадениловая кислота; СА — сывороточный альбумин; ЧСА — сывороточный альбумин человека; ЧСА_м — очищенная мономерная фракция ЧСА; экв. — эквивалент; FAM — остаток флуоресцентного красителя 6-карбоксифлуоресцеина.

* Адресат для корреспонденции.

синтетических (модифицированных) аналогов тНК позволили существенно нивелировать их деградацию [2, 8, 11–17]. Поэтому в настоящее время особое внимание уделяют изучению влияния модификаций тНК-конструкций на их взаимодействие с белками и другими компонентами как крови, так и внутриклеточными, поскольку это может прямым или косвенным образом отразиться как на доставке тНК, так и на эффективности оказываемого тНК биологического эффекта в организме [1, 8, 18–23]. Присоединение гидрофобных остатков к тНК, в частности, холестерина, жирных кислот (ЖК) и липидов, а также других алкилсодержащих группировок, способствует повышению эффективности проникновения таких производных тНК через мембрану внутрь клеток, а также улучшению их фармакокинетических характеристик *in vivo* [8, 10, 24–29]. Среди данных остатков особый интерес представляют группировки, имеющие повышенное сродство к связыванию с сывороточным альбумином (СА) [20, 25, 30–32]. СА, основной белковый компонент сыворотки крови, за счёт низкой иммуногенности, продолжительного времени полужизни, способности накапливаться в тканях, подверженных онкотрансформации и воспалению, а также наличию в своей структуре сайтов связывания различных лигандов, является объектом многочисленных исследований в мире, направленных на разработку систем доставки широкого спектра терапевтических и диагностических средств [33–38]. В свою очередь, связывание СА с олигонуклеотидами и их производными рассматривается как один из способов для создания тНК-содержащих конструкций с целью увеличения их времени циркуляции, повышения биодоступности и стабильности, снижения иммуногенности и, как следствие, уменьшения вероятности неспецифических побочных эффектов и улучшения эффективности действия [20, 30–32]. Вследствие эффекта повышенной проницаемости и удерживания (enhanced permeability and retention, EPR-эффект), характерного для опухоли и её окружения, а также наличия специфических к СА рецепторов, количество которых повышено в некоторых видах рака [37–40], ожидается, что создание альбумин-связанных конструкций будет способствовать улучшению накопления терапевтических средств в тканях опухоли *in vivo*.

Помимо относительно простых конструкций с присоединением липофильных остатков к тНК, актуально направление по созданию самоорганизующихся (и, как правило, определённым образом упорядоченных) систем с

использованием элементов НК-архитектоники [41–45]. Несомненным преимуществом таких сложноорганизованных систем доставки является возможность включения в их состав нескольких, в том числе направляющих, терапевтических либо диагностических, а также стимул-чувствительных компонентов [45–49].

Ранее было показано, что производные олигонуклеотидов, содержащие 3 додецильных остатка в составе ненуклеотидного блока в своей структуре, способны эффективно проникать *in vitro* в клетки аденокарциномы лёгкого А549 и эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека в отсутствие трансфецирующих агентов [50]. Инкубирование додецил-содержащих олигонуклеотидов (ДСО) в присутствии почти 2-кратного избытка бычьего сывороточного альбумина (БСА) приводит к формированию белково-нуклеиновых комплексов [51]. Однако известно, что молекула СА содержит как минимум 7 сайтов связывания остатков жирных кислот, транспорт которых белок осуществляет в организме [52–54].

В данной работе методом задержки в геле мы исследовали связывание БСА и сывороточного альбумина человека (ЧСА) с олигонуклеотидными производными, содержащими 1, 2 или 3 додецильных остатка. Отдельное внимание было уделено оценке возможности комплементарного взаимодействия олигонуклеотидов в составе комплексов НК–белок. Получено, что ДСО с тремя додецильными остатками формируют с альбумином стабильные в условиях электрофореза комплексы, стехиометрия образования которых в эквивалентах (экв.) белок : ДСО составила 1 : (1,25 ± 0,25). Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) была изучена морфология ассоциатов в образцах ЧСА с комплементарными ДСО и ЧСА с полиадениловой кислотой (поли(dA)) и олиготимидилатным ДСО (далее: высокомолекулярных или супрамолекулярных ассоциатов соответственно). Зафиксировано наличие высокомолекулярных ассоциатов ЧСА с дуплексом комплементарных ДСО округлой формы диаметром 165,5 ± 94,3 нм и высотой 28,9 ± 16,9 нм, а также двух популяций супрамолекулярных ассоциатов ЧСА с поли(dA) и олиготимидилатным ДСО размером 315,4 ± 70,9 и 188,3 ± 43,7 нм соответственно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Акриламид («AppliChem GmbH», Германия); бис-акриламид, Кумасси бриллиантовый голубой G-250 («Amresco», США);

ксиленцианоловый голубой, бычий сывороточный альбумин (A7030), натриевая соль поли(2'-дезоксикадениловой кислоты (81342), 1 М MgCl_2 («Sigma», США); сывороточный альбумин человека (фракция V; «Reanal», Венгрия); для выделения мономера использовали ЧСА (P06-26050, «PAN Biotech UK Ltd», Великобритания); ацетон (о.с.ч.) («Реахим», Россия); LiClO_4 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (98–99,85%, «Acros Organics», США); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Bio-Rad Laboratories», США); Tris («Fisher Scientific», США); AcOH (ледяная); деионизованная H_2O 18 М Ω , полученная в системе очистки Simplicity 185 («Millipore», США).

Состав буферных растворов. В работе использовали следующие буферные растворы: TAN – 100 мМ NaCl , 50 мМ Tris-Ac (pH 7,5); TAM – 15 мМ MgCl_2 , 50 мМ Tris-Ac (pH 7,5). Все растворы фильтровали через 0,22 мкм шприцевые фильтры Millipore Syringe Filter units («Merck», Германия).

Синтез олигонуклеотидных производных с остатками додецил-содержащего ненуклеотидного мономерного звена D и флуоресцентного красителя 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) проводили твердофазным амидофосфитным методом на автоматическом НК-синтезаторе АСМ-800 («Биоссет», Россия) с использованием реагентов и протоколов, в том числе постсинтетической очистки, описанных ранее [50–51, 55].

Концентрации растворов ДСО, СА и поли(dA) определяли по измерению поглощения (A) при комнатной температуре с использованием спектрофотометра NanoVue™ («GE Healthcare», США). Молярные коэффициенты поглощения ϵ_{260} ДСО рассчитывали, используя значения ϵ_{260} для моно- и динуклеотидов, приведённые в работе Dunn и Hall [56], ϵ_{260} остатка FAM считали равным 20 900 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Glen Research Technical Bulletin; «Glen Research», США). Молярные коэффициенты поглощения ДСО полагали равными сумме ϵ_{260} соответствующего олигонуклеотида и остатка FAM, вклад ненуклеотидного додецил-содержащего звена в суммарную величину ϵ_{260} ДСО не учитывали. Значения ϵ_{280} альбуминов использовали: 43 824 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ – для БСА и 37 000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ – для ЧСА [57]. Значение концентрации поли(dA) рассчитывали, полагая ϵ_{260} аденина равным 12 300 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Мономерная фракция сывороточного альбумина человека была выделена, как описано в работе Chubarov et al. [58].

Формирование комплексов альбумин-ДСО проводили в растворе TAN (для анализа методом задержки в геле) либо TAM (для АСМ).

Стоковые растворы СА, ДСО и поли(dA) разбавляли до указанных концентраций, соответствующих соотношению смешивания СА : ДСО в экв. За 1 экв. принимали количество моль СА при указанной концентрации и конечном объёме проб 20 мкл. При смешивании комплементарных нуклеотидных последовательностей и СА для анализа методом задержки в ПААГ пробы готовили двумя способами. В первом случае сперва добавляли НК-компоненты, инкубировали (3 мин 95 °C), охлаждали до 37 °C, затем добавляли альбумин. Во втором случае сперва готовили комплексы альбумина с одним из ДСО, смешивая в одной пробирке белок с ДСО 3R, а в другой – белок с 3L, отдельно инкубировали их 30 мин при 37 °C, а затем объединяли в одну пробирку. При приготовлении образцов для исследования методом АСМ сперва смешивали НК-компоненты, инкубировали (3 мин 95 °C), охлаждали до 37 °C, затем добавляли альбумин.

Исследование методом задержки в 8%-ном нативном ПААГ (акриламид : бисакриламид = 29 : 1) проводили с использованием камеры Owl™ Dual-Gel Vertical Electrophoresis System P10DS («Owl separation Systems Inc.», США) при термостатировании системы с помощью циркуляционного термостата F12 («Julabo Inc.», США). Приготовленные, как описано выше, пробы инкубировали 30 мин при 37 °C без перемешивания, затем добавляли 5 мкл водного раствора 30% (v/v) глицерина с 0,05% (w/v) ксиленцианоловым голубым, и 5 мкл из каждой пробы наносили на ПААГ. Относительную подвижность проб анализировали при постоянной мощности 6 Вт и термостатировании камеры для электрофореза при 37 °C. Документирование результатов анализа проводили с помощью сканирования гелей ($E_x/E_m = 488/530$ нм) с использованием системы VersaDoc™ MP 4000 Molecular Imager® System («Bio-Rad Laboratories», США; (ОЦГПМИ) ИХБФМ СО РАН). Интенсивность флуоресценции от полос образцов на электрофореграммах оценивали с помощью программного пакета GelPro 4.0 («Media Cybernetics L.P.», США). Выход кривых на плато определяли с помощью аппроксимации данных методом нелинейной фильтрации в программном обеспечении Origin® («OriginLab», США).

Исследование методом АСМ проводили с использованием сканирующего зондового микроскопа MultiMode 8™ («Bruker», США), подключённого к контроллеру NanoScope® V («Veeco», США). Приготовленные, как описано выше, пробы инкубировали 15 ч при 15 °C

без перемешивания, затем 7 мкл каждой пробы наносили на свежеосколочную поверхность слюды площадью $1 \times 1 \text{ см}^2$, спустя 1 мин промывали 3 раза по 1 мл H_2O 18 МΩ, сушили в токе аргона и исследовали методом АСМ. Остатки проб хранили при 4 °С, и дальнейшее разбавление проводили буферным раствором ТАМ такой же температуры. Изображения поверхности получали в режиме полуконтактной моды Soft tapping микроскопа в атмосферных условиях с помощью алмазоподобного кантилевера NSG10_DLC («NT-MDT Spectrum Instruments», Россия), имеющего параметры радиуса кривизны — 1–3 нм, резонансной частоты — 190–325 кГц и силовой постоянной — 5,5–22,5 Н/м. Полученные изображения обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения Nanoscope Analysis 1.40 («Bruker»).

Статистическая значимость полученных данных. Приведённые в работе электрофореграммы и изображения АСМ исследованных образцов являются результатами одного типичного эксперимента из серии не менее трёх аналогичных. Размерные характеристики комплексов ЧСА с ДСО и с поли(dA) на изображениях АСМ определяли с помощью функций Section и Particle analysis, производя анализ не менее трёх типичных изображений одинакового масштаба из разных мест поверхности слюды с нанесённым образцом. Результат приведён в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на модельной системе, состоящей из серий олигонуклеотидных производных гомотимидилатного (1Т, 2Т, 3Т) и гетеронуклеотидного состава (1N, 2N, 3N), имеющих на 5'-конце остаток 6-карбоксифлуоресцеина и разное число (1–3) последовательно расположенных остатков додецил-содержащего нуклеотидного звена **D** (рис. 1).

Исследование связывания додецил-содержащих олигонуклеотидов с сывороточными альбуминами методом задержки в геле. Для оценки стехиометрии образования комплексов альбумин–ДСО анализировали степень ассоциации олигонуклеотидных производных с белком в зависимости от соотношения СА:ДСО. Для этого провели серию экспериментов, добавляя к 0,1 нмоль альбумина (1 экв.) ДСО, количество которого варьировали от 0,5 до 3 экв. по отношению к белку. Электрофоретическая подвижность не связанного с белком ДСО значительно выше, чем подвижность СА. Поэтому при добавлении альбумина к ДСО на электрофореграмме можно наблюдать появление ДСО-содержащих полос с более низкой подвижностью в ПААГ, соответствующих образованию альбумин-олигонуклеотидных комплексов СА••ДСО (здесь и далее знак •• будет обозначать связывание СА с ДСО) [51]. Область подвижности данных комплексов далее на представленных электрофореграммах обозначена красной квадратной скобкой,

Обозначение Нуклеотидная последовательность 5'→3'

Контрольный олигонуклеотид:

0Т FAM-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Додецил-содержащие производные:

1Т FAM-D-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

2Т FAM-DD-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

3Т FAM-DDD-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

1N FAM-D-GGTAGCAAGTCGAGACT

2N FAM-DD-GGTAGCAAGTCGAGACT

3N FAM-DDD-GGTAGCAAGTCGAGACT

Комплементарные додецил-содержащие производные:

3R FAM-DDD-GATATGATGACGTTAGTTAG

3L FAM-DDD-CTAATAACGTCATCATATC

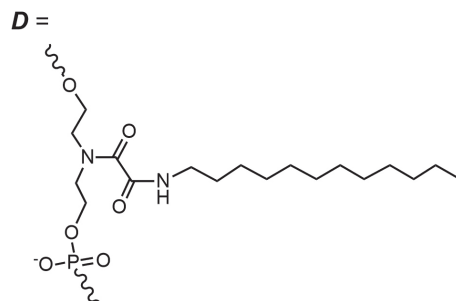


Рис. 1. Структуры олигодезоксирибонуклеотидных производных. FAM — остаток 6-карбоксифлуоресцеина; **D** — структура нуклеотидного додецил-содержащего звена в составе олигонуклеотида

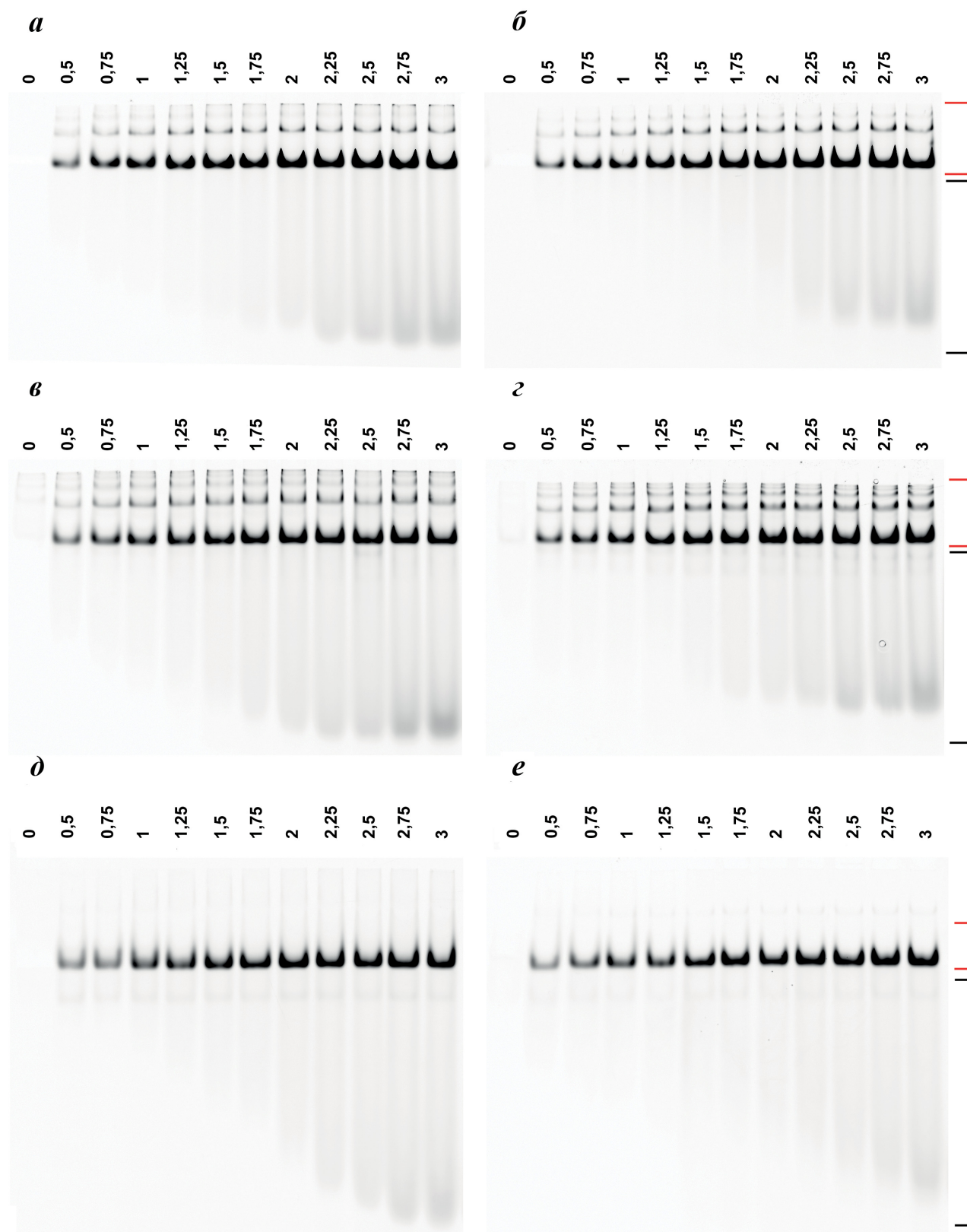


Рис. 2. Электрофореграмма относительной подвижности комплексов БСА (*a* и *б*), ЧСА (*в* и *г*) и мономерной фракции ЧСА_м (*д* и *е*) с ДСО 3R (*a*, *в*, и *д*) и 3L (*б*, *г*, и *е*) в 8%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. Каждая проба содержала 5 мкМ белка в растворе TAN, объём пробы – 20 мкл. Цифры над дорожками соответствуют эквивалентам ДСО в составе пробы. За 1 экв. было принято количество вещества альбумина, равное 0,1 нмоль. Пробы готовили и анализировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Красной квадратной скобкой обозначена область, соответствующая подвижности комплексов белка с ДСО в данных условиях, чёрной – область подвижности свободного ДСО

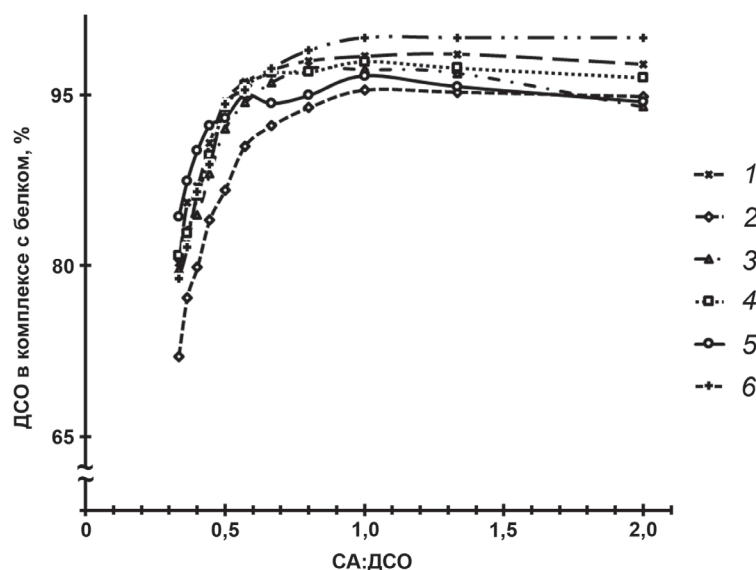


Рис. 3. Зависимость количества ДСО в комплексе с белком (%) от значения соотношения СА к ДСО (в экв.). За 1 экв. было принято количество вещества $n(\text{CA})$, равное 0,1 нмоль. 1 – БСА••3L; 2 – ЧСА••3R; 3 – ЧСА••3L; 4 – ЧСА_м••3R; 5 – ЧСА_м••3L; 6 – БСА••3R

а область подвижности не связанного с белком ДСО – чёрной (рис. 1П в Приложении 1; рис. 2). Полос, соответствующих комплексам СА••ДСО, несколько, так как сывороточный альбумин, помимо мономера, также существует в виде димера и других олигомерных форм [58–59], с которыми, как было нами ранее показано, ДСО также связывается [51].

Исследование влияния количества введенных в олигонуклеотид додецильных остатков на степень сродства ДСО к связыванию с альбумином показало, что ДСО с одним (1Т, 1N) и один из ДСО с двумя остатками (2Т) не образуют с БСА комплексов, устойчивых в условиях электрофоретического анализа (рис. 1П, а, б и г в Приложении 1). Другое производное с двумя (2N) и производные с тремя додецильными остатками (3Т, 3N) способны формировать с БСА комплексы с более низкой электрофоретической подвижностью в сравнении со свободными ДСО (рис. 1П, в, д и е в Приложении 1). При этом в дорожках с комплексами БСА••2N (рис. 1П, д в Приложении 1) наблюдается размывание флуоресцентного сигнала ДСО вне зависимости от его количества, добавляемого к белку, что не позволяет оценить стехиометрию формирования данного комплекса. Стехиометрия образования комплексов БСА••3Т и БСА••3N составила не более 1 : 1,5 (БСА : ДСО), так как на полученных электрофореграммах при соотношении 1 : 1,5 и выше (рис. 1П, в и е в Приложении 1) мы наблюдали накопление флуоресцентного сигнала от свободного, не связанного с белком, ДСО.

Сравнительное исследование связывания ДСО с гомологичными альбуминами БСА и ЧСА, а также очищенной мономерной фракцией ЧСА (ЧСА_м) показало, что ДСО 3R и 3L (рис. 1) образуют стабильные комплексы со всеми указанными вариантами СА (рис. 2, а–г). Полученные электрофореграммы были использованы для расчёта долей связанного с белком и свободного ДСО, исходя из интенсивности флуоресценции соответствующих полос для каждой из проб. Зависимости количества связанного с белком ДСО от значения соотношения СА : ДСО имеют вид кривых с выходом на плато в диапазоне 0,67–1 по оси абсцисс (рис. 3), что соответствует стехиометрии образующихся ассоциатов в среднем 1 : (1,25 ± 0,25) (СА : ДСО, в экв.).

Олигонуклеотидные производные 3R и 3L являются комплементарными (рис. 1) и могут образовывать дуплекс (3R/3L), температура плавления которого в исследуемых условиях, согласно данным OligoAnalyzer [60], составляет ~ 52 °С, что свидетельствует о его стабильности. Было показано, что как при добавлении любого из вариантов исследуемых альбуминов к преформированному дуплексу 3R/3L, так и при смешивании растворов преформированных комплексов СА••3R с комплексами СА••3L наблюдается образование белково-олигонуклеотидных ассоциатов, отличных по своей подвижности от ранее зафиксированных (рис. 4). Флуоресцентный сигнал от формирующихся в образцах, содержащих СА, 3R и 3L, комплексов регистрируется на электрофореграмме, в том числе в области кармана

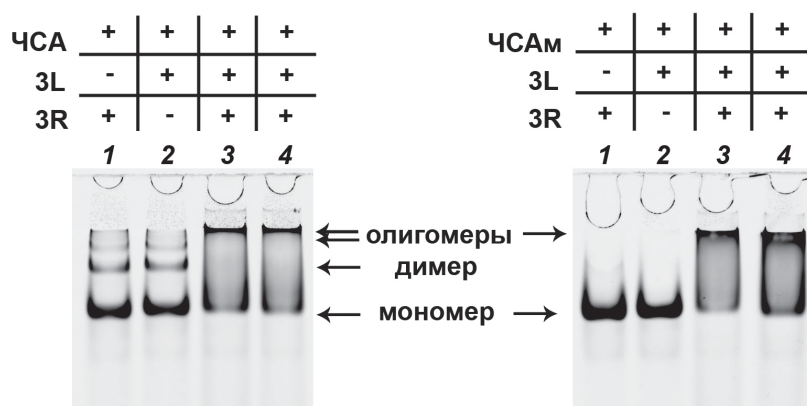


Рис. 4. Электрофореграмма относительной подвижности комплексов ЧСА (слева) и мономерной фракции ЧСА_м (справа) с ДСО 3R и 3L в 8%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. Каждая проба содержала 0,1 нмоль белка в растворе TAN, 0,175 нмоль 3R и/или 3L (указано знаком «+»), объем проб – 20 мкл. Цифрами указаны номера дорожек. Методики приготовления проб для нанесения на дорожки 1–4 отличались. 1 и 2 – Готовили разбавлением стоковых растворов СА и ДСО до необходимых концентраций. 3 – Готовили, добавив в буферный раствор сперва ДСО 3R и 3L, после чего инкубировали 3 мин при 95 °С, охлаждали до 37 °С, затем добавляли альбумин и инкубировали 30 мин при 37 °С. 4 – Готовили последовательно: сперва в двух отдельных пробирках смешивали по 0,05 нмоль СА с 0,175 нмоль 3R и 0,05 нмоль СА с 0,175 нмоль 3L так, чтобы конечный объем в каждой пробирке составил 10 мкл, после чего данные пробирки инкубировали 30 мин при 37 °С, чтобы образовался комплекс СА•ДСО, а затем содержимое пробирок объединяли в одну и инкубировали ещё 30 мин при 37 °С. По прошествии времени инкубации пробы наносили на ПААГ и анализировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Стрелками указана область подвижности соответствующих форм сывороточного альбумина, связанного с ДСО

на границе буферный раствор–ПААГ (рис. 4). Данная область является характерной для подвижности олигомеров сывороточного альбумина (рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют о частичном образовании высокомолекулярных ассоциатов, вероятно, морфология (форма и/или размер) которых препятствует их движению в 8%-ном ПААГ.

Таким образом, результаты, полученные с помощью метода задержки в геле, свидетельствуют о способности ДСО связываться с БСА и ЧСА, включая его очищенную мономерную фракцию, в условиях, близких к физиологическим, с образованием как комплексов со стехиометрией белок : ДСО в среднем 1 : (1,25 ± 0,25) (в экв.), так и высокомолекулярных ассоциатов, формирование которых может быть обусловлено комплементарным взаимодействием ДСО, связанных с белком.

Исследование ассоциатов альбумина с комплементарными додецил-содержащими производными методом атомно-силовой микроскопии. Для изучения морфологии полученных высокомолекулярных ассоциатов образец, содержащий преформированный дуплекс 3R/3L и ЧСА, был исследован методом АСМ. Было обнаружено, что при концентрации ЧСА 0,4 мкМ (и ДСО – 1,2 мкМ) поверхность слюды с нанесённым образцом (3R/3L + ЧСА) содержит крупные частицы округлой формы, диаметром 165,5 ± 94,3 нм и высотой 28,9 ± 16,9 нм, расположенные на слое значительно более мелких частиц диаметром 12,0 ± 2,3 нм и высотой не

более 3 нм (рис. 1П и 2П в Приложении 2). Поскольку мелкие частицы образовывали плотное покрытие на поверхности, мы предположили, что в данных условиях при концентрации ЧСА 0,4 мкМ это может свидетельствовать о перенасыщении поверхности слюды белком вследствие его хорошей адсорбции. Разбавив образец (3R/3L + ЧСА) в 10 раз, мы снова наблюдали редко представленные крупные частицы аналогичного размера (рис. 3П и 4П в Приложении 2). Данные частицы характеризовались однородной структурой без каких-либо отдельно просматривающихся компонентов внутри (рис. 5П в Приложении 2). Слой мелких частиц стал менее плотным (рис. 3П и 6П в Приложении 2) и было отмечено, что некоторые из мелких частиц располагались на поверхности парами на минимальном расстоянии друг от друга (рис. 6П в Приложении 2).

В контрольном образце дуплекса 3R/3L при концентрации ДСО 0,12 мкМ были обнаружены крупные частицы диаметром 101,8 ± 31,6 нм и высотой 30,8 ± 10,7 нм (рис. 7П и 8П в Приложении 2) и единично представленные мелкие частицы, диаметр и высота которых не превышали 10 и 3 нм соответственно (рис. 9П в Приложении 2).

В контрольном образце 0,04 мкМ ЧСА без добавления ДСО мы наблюдали только множество низких (высотой до 1,5 нм) мелких (диаметром до 20 нм) частиц (рис. 10П и 11П в Приложении 2).

Исследование ассоциатов альбумина с комплексами поли(dA) и олиготимидилатными олигонуклеотидами методом атомно-силовой микроскопии. Для исследования способности связывания СА с ДСО в составе супрамолекулярных ассоциатов методом АСМ был исследован образец, состоящий из предварительно сформированных комплексов поли(dA) с олиготимидилатным ДСО 3Т, к которым затем был добавлен ЧСА: (поли(dA) + 3Т + ЧСА).

На первом этапе были изучены типичные топографические изображения слюды с нанесёнными на её поверхность контрольными образцами сравнения — ЧСА, а также комплексов (поли(dA) + 3Т) и (поли(dA) + 0Т) (рис. 12П–22П в Приложении 2). Образец (поли(dA) + 0Т) был выбран в качестве образца сравнения, поскольку известно, что СА может взаимодействовать с нативными НК, не содержащими липофильные остатки [61]. Видно, что образец ЧСА визуализируется на поверхности в виде слоя типичных округлых частиц, большинство из которых менее 20 нм, но присутствуют также более крупные частицы диаметром ~ 25–35 нм (рис. 12П–14П в Приложении 2). Поверхность слюды с образцом (поли(dA) + 3Т) (рис. 15П, 17П, 19П и 21П в Приложении 2) представлена как дцДНК-подобными обрывочными фрагментами линейной формы, так и эллипсоид-подобными фрагментами (40 × 15 нм; рис. 21П в Приложении 2). В контрольном образце (поли(dA) + 0Т) видна сеть из линейных дцДНК-цепей, которые, предсказуемо, из-за реализации связывания гомо(олиго/поли)-нуклеотидных последовательностей способны формировать разветвлённые формы ДНК (рис. 16П, 18П, 20П и 22П в Приложении 2). В отличие от образца (поли(dA) + 3Т), в образце (поли(dA) + 0Т) наблюдаются более протяжённые цепи (рис. 20П и 22П в Приложении 2). Анализ показывает, что в случае (поли(dA) + 0Т) на типичном поле наблюдения масштабом 1 мкм² визуализируется 20 ± 1 точек ветвления дцДНК, тогда как для (поли(dA) + 3Т) — всего 1–2 точки (рис. 19П и 20П в Приложении 2).

На поверхности слюды, содержащей (поли(dA) + 3Т + ЧСА) мы наблюдали частицы округлой формы и редко представленные кольцеобразные структуры (рис. 23П, 25П, 27П, 29П, 30П и 32П в Приложении 2; рис. 5, а, б, г и д). Внешний диаметр кольцеобразных структур варьировал от 65 до 200 нм (рис. 31П и 32П в Приложении 2; рис. 5, в и е). Следует отметить, что каждая из зафиксированных нами кольцевых структур типично имела несколько утолщённых участков (рис. 5, в и е; рис. 31П и 32П в При-

ложении 2). Размер частиц округлой формы в образце (поли(dA) + 3Т + ЧСА), по данным АСМ, соответствовал таковому для контрольного образца ЧСА (рис. 12П–14П в Приложении 2). Мы предположили, что в данных условиях (концентрация ЧСА — 1 мкМ) это снова может свидетельствовать о перенасыщении поверхности слюды альбумином из-за повышенного сродства именно белка к неорганической поверхности. Поэтому были исследованы образцы (поли(dA) + 3Т + ЧСА), разбавленные в 100 раз (концентрация ЧСА — 10 нМ). На типичных топографических изображениях слюды (рис. 33П, 35П и 37П в Приложении 2; рис. 5, ж–и), как и ожидалось, отсутствовал ранее наблюдаемый белковый слой, и мы фиксировали крупные (отдельные — до 500 нм в диаметре) образования из хорошо различимых нитевидных составляющих (рис. 5, и). Среди данных образований можно выделить две популяции крупного (315,4 ± 70,9 нм) (рис. 41П в Приложении 2) и более мелкого (188,3 ± 43,7 нм) размера. Образования в большинстве случаев имели форму близкую к округлой. Толщина отдельной нитевидной составляющей внутри этих образований была ~ 11 нм (рис. 39П в Приложении 2), что соответствует типичным дцДНК-структурам, наблюдаемым методом АСМ в контрольных экспериментах (рис. 21П и 22П в Приложении 2).

Полученные изображения для образца (поли(dA) + 0Т + ЧСА) при концентрации ЧСА 1 мкМ (рис. 24П, 26П и 28П в Приложении 2) были схожими с изображениями контрольного образца 1 мкМ ЧСА (рис. 12П–14П в Приложении 2) и для образца (поли(dA) + 3Т + ЧСА). Однако в образце (поли(dA) + 0Т + ЧСА) не было найдено кольцеобразных структур как до (рис. 24П, 26П, 28П в Приложении 2), так и после его разбавления (рис. 34П, 36П, 38П в Приложении 2). После разбавления образца (поли(dA) + 0Т + ЧСА) мы наблюдали наличие главным образом линейных и в значительной степени укороченных фрагментов дцДНК (рис. 38П в Приложении 2), содержащих округлые, белок-подобные возвышения/утолщения как внутри, так и на концах цепи ДНК (рис. 40П в Приложении 2). Похожие округлые возвышения/утолщения, напоминающие частицы белка, мы наблюдали в структурах зафиксированных образований в образце (поли(dA) + 3Т + ЧСА) (рис. 5, и; рис. 39П и 42П в Приложении 2).

Таким образом, с помощью метода АСМ было обнаружено, что в указанных условиях результатом взаимодействия ЧСА с дуплексом комплементарных ДСО могут являться

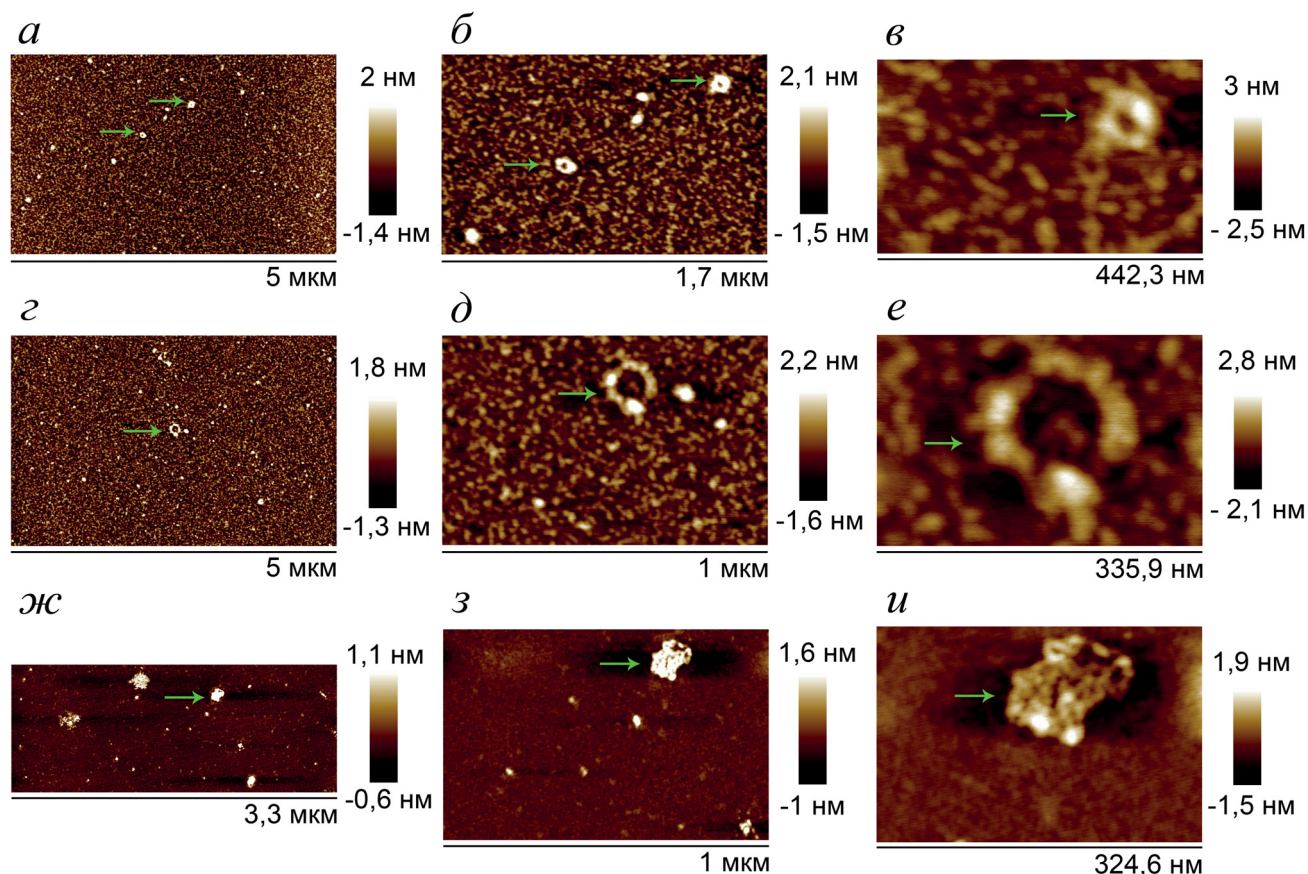


Рис. 5. Топографические изображения слюды, полученные методом АСМ, с нанесённым на неё образцом (поли(dA) + 3T + ЧСА) в растворе ТАМ до разбавления (а–е) и после (ж–и). Концентрация поли(dA) – 23 мкМ (а–е) и 0,23 мкМ (ж–и); ДСО – 0,5 мкМ (а–е) и 5 нМ (ж–и); ЧСА – 1 мкМ (а–е) и 10 нМ (ж–и). Пробы готовили и анализировали, как описано в разделе «Материалы и методы»

округлые высокомолекулярные ассоциаты диаметром $165,5 \pm 94,3$ нм и высотой $28,9 \pm \pm 16,9$ нм, а результатом взаимодействия ЧСА с комплексами поли(2'-дезокс)адениловой кислоты и олиготимидилатного ДСО могут являться супрамолекулярные ассоциаты, самоорганизованные главным образом в виде субмикронных структур. Такие структуры представлены двумя основными популяциями размером $315,4 \pm 70,9$ и $188,3 \pm 43,7$ нм. При этом их высота не превышала 2,5 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возможность связывания альбумина с олигонуклеотидами продемонстрирована как для нативных НК [61], так и для их синтетических аналогов, модифицированных по углеводно-фосфатному остову [19], а также для содержащих липофильные группировки олигонуклеотидных производных [20, 25, 30–32]. Было отмечено, что липофильные производные тНК, обладающие высоким сродством к альбумину, демонстрируют улучшенные фармако-

кинетические характеристики и эффективность действия [20, 29–31], а эффективность действия антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих остатки жирных кислот, коррелирует со степенью их сродства к СА [25]. Параметры связывания липофильных производных тНК с альбумином, например, стабильность и стехиометрия формирующихся комплексов, зависят от типа модификаций в составе тНК, её последовательности и вторичной структуры [20, 30–32].

В данной работе мы изучили олигонуклеотидные производные, содержащие от 1 до 3 липофильных додецильных остатков **D**. Последовательное увеличение числа остатков **D** позволило нам отследить, как повышение гидрофобности олигонуклеотида влияло на его сродство к СА. В качестве олигонуклеотидных составляющих ДСО мы использовали либо гомотимидилатные, либо гетеронуклеотидные последовательности, значительно отличающиеся по таким физико-химическим характеристикам, как стэкинг азотистых оснований внутри цепи и образование вторичных структур [62]. Наше исследование демонстрирует,

что степень сродства ДСО к альбумину симбатна количеству введённых гидрофобных додецильных остатков (рис. 1П в Приложении 1). Наличие одного додецильного остатка в составе олигонуклеотидов (на примере 1Т и 1N) не обеспечивало стабильности образующихся комплексов БСА••1Т и БСА••1N, по данным электрофоретического анализа. В случае введения двух остатков D мы регистрировали формирование частично устойчивых комплексов БСА••2N, то есть для производного с гетеронуклеотидной последовательностью (рис. 1П, д в Приложении 1). В то же время для 2Т нам удалось зафиксировать, по всей видимости, факт диссоциации соответствующего комплекса ДСО с альбумином в процессе анализа: чётких полос, характеризующих подвижность комплексов БСА••2Т, не регистрируется. Полученные данные указывают, что нуклеотидная последовательность ДСО может оказывать влияние на стабильность их комплексов с альбумином. Разное сродство к связыванию с СА в зависимости от нуклеотидной последовательности ранее было описано для тиофосфатных аналогов олигонуклеотидов [19]. В нашем случае, вероятно, после закрепления алифатических остатков ДСО в сайтах предполагаемого гидрофобного взаимодействия с молекулой белка олигонуклеотидная цепь в зависимости от её последовательности имеет разные возможности для реализации сети дополнительных низкоспецифических контактов белок–НК. При этом наиболее гидрофобные производные ДСО, содержащие 3 додецильных остатка, образовывали стабильные комплексы со всеми вариантами образцов СА, используемых в работе.

Нами была установлена стехиометрия образования стабильных комплексов СА••ДСО для трёх различных препаратов сывороточных альбуминов: выделенного мономера из фракции V по методу Кона ЧСА, фракции V по методу Кона ЧСА и фракции V по методу Кона БСА (без жирных кислот). Показано, что в среднем с молекулой белка любого из исследованных видов СА может связаться $1,25 \pm 0,25$ молекул ДСО с тремя додецильными остатками. Мы полагаем, что данный факт свидетельствует о присутствии в образцах комплексов альбумина с ДСО по крайней мере двух популяций ассоциатов: СА••(ДСО)₁, когда с белком связана 1 молекула ДСО, и СА••(ДСО)₂ — когда связаны 2 молекулы. Согласно литературным данным, в физиологических условиях молекула ЧСА осуществляет транспорт до 2 молекул ЖК [63–64]. Больше количество ЖК (до 4 молекул) альбумин может

транспортировать в случае напряжённых физических нагрузок или адренергической стимуляции [64]. Установленные сайты связывания остатков ЖК в молекуле ЧСА обсуждались ранее [52, 65–68]. В экспериментах *in vitro* при инкубации СА в присутствии значительных избытков ЖК удалось получить кристаллические структуры ЧСА, в которых с молекулой белка связано 7–8 молекул ЖК [65]. Так, методом РСА была установлена структура ЧСА в комплексе с восемью молекулами лауриновой (C₁₁H₂₃COOH) кислоты (рис. 6, а), алифатический остаток которой близок по длине к додецильному (C₁₂H₂₄–) в составе ДСО. Отмечается, что сайты связывания 2, 4 и 5 характеризуются высоким сродством к ЖК, а сайты связывания 1, 3 и 6 — средним сродством (рис. 6, а) [65, 68]. Сайт 7, по некоторым данным, может являться одним из главных сайтов связывания для короткоцепочечных ЖК [65]. Мы предполагаем, что связывание ДСО с альбумином происходит в местах расположения вышеописанных высокоаффинных сайтов связывания остатков ЖК, что обеспечивает стабильность комплексов СА••ДСО в условиях электрофоретического анализа. Вероятно, именно комбинация сайтов связывания, занимаемых додецильными остатками первого ДСО, может определять возможность взаимодействия с СА второй молекулы ДСО. Альбумин является белком, подверженным аллостерической модуляции, когда связывание некоторых лигандов может влиять на взаимодействие других лигандов в других сайтах молекулы СА [69], в том числе делая такое взаимодействие невозможным. Также популяции СА••(ДСО)₁ и СА••(ДСО)₂ могут иметь различную устойчивость в условиях электрофоретического разделения, в частности, более «нагруженный» комплекс белка с ДСО может диссоциировать, не позволяя зафиксировать его наличие методом задержки в геле.

В отличие от ЧСА, о сайтах связывания БСА с ЖК в литературе представлено меньше данных. Известно, что БСА и ЧСА имеют высокую гомологию, оба состоят из 3 (I–III) также гомологичных доменов, разделённых на 2 субдомена (А и В) [64, 70]. Наглядно сравнение структур данных белков приведено в работе Golianová et al. [71], где также обозначены основные сайты связывания гидрофобных соединений в БСА. В нашей работе стехиометрия образования комплексов альбумина с ДСО отличалась незначительно в случаях с БСА, ЧСА или его мономерной фракции ЧСА_м (рис. 3), что свидетельствует о реализации схожих механизмов связывания рассматриваемых

Значимое количество флуоресцентно меченой ДНК в этом случае регистрируется локализованной вблизи дна кармана для нанесения образца.

На рис. 6, б–г под соответствующими римскими цифрами приведены теоретически возможные (I) и экспериментально наблюдаемые (II) изображения электрофореграмм, характеризующих подвижность ассоциатов с участием ЧСА, **3R** и **3L** (рис. 4). Заметим, если предположить, что с СА связывается 1 молекула **3R** или **3L**, тогда образующиеся комплексы **СА••3R** и **СА••3L** (схематично представлены на рис. 6, б) при реализации комплементарного взаимодействия должны привести к «сцепке» 2 молекул белка (**СА••3R/3L••СА**) при условии, что связанные молекулы ДСО способны реализовать такое взаимодействие. Подвижность такого ассоциата (**СА••3R/3L••СА**) (схематично представлен на рис. 6, в) не должна быть ниже подвижности олигомеров альбумина, состоящих из более чем 2 молекул белка (рис. 4), а должна быть близка к подвижности димера СА. Таких полос при соотношении **СА : 3R : 3L** = 1 : 1,5 : 1,5 (в экв.) и времени инкубации проб 30 мин мы не наблюдали (рис. 4; рис. 6, в). Однако при соотношении **ЧСА_м : 3R : 3L** = 1 : 0,25 : 0,25 (в экв.) и времени инкубации 15 мин нам удалось зафиксировать ассоциат (рис. 2П в Приложении 1; дорожка 8 на панелях а и б, обозначен стрелкой красного цвета), по всей видимости, состава (**ЧСА_м••3R/3L••ЧСА_м**), поскольку его подвижность была сопоставима с подвижностью димера ЧСА и комплексов димера ЧСА с одним ДСО (рис. 2П в Приложении 1; дорожка 2 на панели б и дорожки 6, 7 на панелях а и б). При увеличении количества комплементарных ДСО мы наблюдали постепенное уменьшение подвижности данной полосы (рис. 2П в Приложении 1; дорожки 9–12 на панелях а и б), вероятно, вызванное участием ассоциата (**ЧСА_м••3R/3L••ЧСА_м**) в дальнейшем образовании более высокомолекулярных ассоциатов.

Если же с молекулой белка способно связаться 2 и более молекул ДСО, то в этом случае возможно образование более сложно организованных высокомолекулярных ассоциатов (схематично представлены на рис. 6, г) и их подвижность может быть значительно ниже мономерной и димерной форм белка (рис. 4). В нашем случае при соотношении **СА : 3R : 3L** = 1 : 1,5 : 1,5 (в экв.) и времени инкубации проб 30 мин мы наблюдали именно это (рис. 4; рис. 6, б–г). Образование данных высокомолекулярных ассоциатов происходит только в присутствии комплементарных ДСО;

при добавлении даже 6-кратного избытка одного из ДСО их формирования не наблюдалось (рис. 2П в Приложении 1; дорожка 1), что позволяет сделать вывод о вкладе именно Уотсон-Криковских взаимодействий в их организацию.

Для изучения морфологии образующихся высокомолекулярных ассоциатов мы использовали метод АСМ. Было обнаружено, что в образце (**3R/3L + ЧСА**) присутствуют крупные по диаметру и высоте округлые частицы (рис. 1П, 3П–5П в Приложении 2), структура которых ввиду своей однородной плотности не позволяет однозначно заключить, участвует ли в их образовании белок или нет. С одной стороны, похожие крупные частицы были зафиксированы нами в контрольном образце дуплекса **3R/3L** (рис. 7П и 8П в Приложении 2), где они, по всей видимости, являются мицеллами, сформированными ДСО за счёт наличия липофильных додецильных остатков по обоим концам дуплекса. Образование мицелл характерно как для ДСО по ранее полученным нами данным [51], так и для других производных олигонуклеотидов с липофильными остатками [31], при этом размер мицелл зависит от условий экспериментов (концентрации ДСО, pH среды, вида и концентрации солей, температуры, времени инкубации). С другой стороны, электрофоретическая подвижность образцов **3R/3L** и (**3R/3L + ЧСА**) значительно отличается (рис. 3П в Приложении 1). Образец **3R/3L** при концентрации каждого из ДСО 15 мкМ имеет вид нечёткой растянутой полосы в геле, что свидетельствует в пользу формирования мицелл дуплексом ДСО. Однако при добавлении к дуплексу **3R/3L** белка мы не наблюдали подобного вида полос в образце (**3R/3L + ЧСА**), часть которого визуализируется ближе к области кармана для нанесения. Это может свидетельствовать о том, что формирование высокомолекулярных ассоциатов в данном случае происходит уже с участием белка, молекулярная масса которого значительно превышает таковую для ДСО и может приводить к существенному снижению электрофоретической подвижности образующихся ассоциатов. Мы предположили, что размер дуплекса **3R/3L** (~ 7 нм из расчёта 0,34 нм на одно нуклеотидное звено) слишком мал в сравнении с данными о размере ЧСА (~ 6–13 нм) [38, 72], чтобы было возможным отличить с помощью метода АСМ олигонуклеотидные цепи в составе высокомолекулярных ассоциатов от частиц, являющихся молекулами белка, и оценить количество его молекул, входящее в их состав. Поэтому далее мы исследовали образец ЧСА

с комплексами (поли(dA) + 3T). Теоретически с молекулой полиадениловой кислоты может связаться несколько молекул олиготимидилата с образованием протяжённых дуплексов, которые также могут соединяться по типу формирования конкатамеров в случае связывания олиготимидилата с разными молекулами поли(dA). Мы предположили, что такая система будет более пригодна для сравнительного исследования связывания альбумина с ДСО с помощью метода АСМ по аналогии применения данного метода для визуализации связанных с протяжёнными ДНК других белков [73].

Полученные нами данные исследования супрамолекулярных ассоциатов методом АСМ свидетельствуют, что без альбумина как нативный 0T, так и додецил-содержащий 3T олиготимидилаты образовывали с поли(dA)-матрицей конкатамерные ДНК-подобные комплексы (рис. 15П–22П в Приложении 2): в обоих образцах наблюдали фрагменты высотой до 1,5 нм и шириной в местах без утолщений/возвышений — 10–15 нм (рис. 21П и 22П в Приложении 2). Наблюдаемые более короткие фрагменты и существенно меньшее количество точек их разветвления (рис. 19П и 20П в Приложении 2) в образце (поли(dA) + 3T) в сравнении с (поли(dA) + 0T) позволяют предположить, что наличие додецильных остатков в ДСО способствует ограничению длины образующихся конкатамерных комплексов в образце (поли(dA) + 3T). Вероятно, додецильные остатки могут препятствовать кооперативному связыванию содержащих их олиготимидилатов на поли(dA)-матрице, поэтому образец (поли(dA) + 3T) имел вид неупорядоченно расположенных укороченных фрагментов (рис. 19П в Приложении 2). Либо алифатический додецильный остаток способствует сворачиванию/изгибу НК-цепи за счёт образования гидрофобных скрепок ДСО, расположенных на одной или разных поли(dA)-матрицах, как было показано ранее [74–75]. Изображение же образца (поли(dA) + 0T) соответствовало виду «классических» конкатамерных комплексов (рис. 18П и 20П в Приложении 2) по аналогии с работой Виноградовой и соавт. [76]. Наличие утолщений/возвышений в обоих образцах (рис. 21П и 22П в Приложении 2) также может быть обусловлено возможностью образования триплексов в данных образцах [77].

Добавление альбумина к контрольному образцу (поли(dA) + 0T) привело к уменьшению наблюдаемой длины конкатамерных комплексов, по нашему предположению, из-за сродства НК к альбумину [19, 61], что также может нарушать кооперативность связывания олиго-

тимидилата с полиадениловой кислотой. При этом более высокое сродство додецильных остатков к белку послужило причиной самоорганизации разбросанных до этого по поверхности обрывочных фрагментов ДНК в образце (поли(dA) + 3T) в сравнительно крупные округлые образования, состоящие из отдельных нитевидных компонентов (рис. 5, ж–и), в образце (поли(dA) + 3T + ЧСА). Толщина данных «нитей» близка к таковой для фрагмента ДНК и составила ~ 11 нм (рис. 39П в Приложении 2). Следует отметить, что в данных структурах были различимы округлые возвышения/утолщения, близкие по размеру к частицам белка (рис. 5, и; рис. 42П в Приложении 2). Вероятно, реализующиеся взаимодействия СА•ДСО в качестве «скрепок» могли способствовать объединению комплексов (поли(dA) + 3T) в зафиксированные более сложные структуры в образце (поли(dA) + 3T + ЧСА). Данные популяции округлых или близких к овальной форме крупных ($315,4 \pm 70,9$ нм) и менее крупных ($188,3 \pm 43,7$ нм) структур, сформированных из переплетённых «нитей», таким образом, можно квалифицировать как прототип наногелей с элементами НК-архитектоники по аналогии с работами Thelu et al [41], Li et al [46], Zhang и Tung [78] и Lacroix et al [79]. При этом зарегистрированные нами кольцеобразные структуры (рис. 5, а–е) в этом же образце (поли(dA) + 3T + ЧСА) до его разбавления могли являться лишь «выпетливаниями» данных образований в избыточно присутствующем белковом слое.

С учётом известной способности СА к желированию с образованием гелей, отличающихся фазовым состоянием [80], а также стремительного развития направления ДНК-оригами и дизайна основанных на данном принципе систем доставки для тНК, полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале ДСО и СА как соединений-составляющих для создания новых многокомпонентных самоорганизующихся систем, в том числе обладающих свойствами биосовместимых наночастиц или наногелей. Важность создания подобных систем для решения задач молекулярной биологии и биомедицины отмечается ведущими научными изданиями [2]. При этом следующим этапом подтверждения потенциала систем доставки на основе СА и ДСО должны стать исследования их активности, возможных токсических эффектов и предполагаемых механизмов действия с использованием не только клеточных культур, но и объектов *in vivo*, например, специальных линий мышей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в представленном исследовании результаты, наряду с достаточно быстрым связыванием ДСО с сывороточным альбумином в условиях, близких к физиологическим, а также ранее продемонстрированными фактами, что связывание ДСО с СА на 30% снижает, но не предотвращает их проникновения внутрь клеток *in vitro* [51] и отсутствием цитотоксичности в рабочем диапазоне концентраций [50], делают привлекательным использование таких олигонуклеотидных производных для разработки препаратов-транспортёров тНК, в том числе на основе аутологичной крови пациента. На следующих этапах необходимо продолжить исследования, чтобы изучить другие свойства ДСО, способные оказать влияние на их фармакодинамику и фармакокинетику в организме.

Вклад авторов. А.С. Павлова — реализация концепции исследования, постсинтетическое выделение ДСО, проведение экспериментов (метод задержки в ПААГ и АСМ), обработка и анализ полученных данных, написание текста статьи; В.В. Илющенко — проведение экспериментов (метод задержки в ПААГ), анализ и обработка первичных данных; Т.Д. Жарков,

М.С. Купрюшкин, Е.С. Дюдеева — синтез и постсинтетическое выделение ДСО и контрольных олигонуклеотидов; И.А. Бауэр, А.С. Чубаров — выделение и очистка мономерной фракции ЧСА; Д.В. Пышный, И.А. Пышная — концепция и руководство работой, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование проводилось в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

Благодарности. А.С.П. выражает благодарность к.ф.-м.н., зав. ЛСТБ ИХБФМ СО РАН Ломзову А.А. и к.ф.-м.н., н.с. ЛСТБ ИХБФМ СО РАН Голышеву В.М. за полезные консультации по использованию метода АСМ. В работе использовали оборудование VersaDoc™ MP 4000 Molecular Imager® System («Bio-Rad Laboratories», США) Объединённого Центра геномных, протеомных и метаболомных исследований (ОЦГПМИ) ИХБФМ СО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith, C. I. E., and Zain, R. (2019) Therapeutic oligonucleotides: state of the art, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **59**, 605-630, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021050.
- Roberts, T. C., Langer, R., and Wood, M. J. A. (2020) Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **19**, 673-694, doi: 10.1038/s41573-020-0075-7.
- Gökirmak, T., Nikan, M., Wiechman, S., Prakash, T. P., Tanowitz, M., and Seth, P. P. (2021) Overcoming the challenges of tissue delivery for oligonucleotide therapeutics, *Trends Pharmacol. Sci.*, **42**, 588-604, doi: 10.1016/j.tips.2021.04.010.
- Bakowski, K., and Vogel, S. (2022) Evolution of complexity in non-viral oligonucleotide delivery systems: from gymnotic delivery through bioconjugates to biomimetic nanoparticles, *RNA Biol.*, **19**, 1256-1275, doi: 10.1080/15476286.2022.2147278.
- Crooke, S. T., Baker, B. F., Crooke, R. M., and Liang, X.-H. (2021) Antisense technology: an overview and prospectus, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **20**, 427-453, doi: 10.1038/s41573-021-00162-z.
- Mullard, A. (2023) 2022 FDA approvals, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **22**, 83-88, doi: 10.1038/d41573-023-00001-3.
- Egli, M., and Manoharan, M. (2023) Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 2529-2573, doi: 10.1093/nar/gkad067.
- Juliano, R. L. (2016) The delivery of therapeutic oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 6518-6548, doi: 10.1093/nar/gkw236.
- Juliano, R. L. (2021) Manipulation of the endosome trafficking machinery: implications for oligonucleotide delivery, *Biomedicines*, **9**, 512, doi: 10.3390/biomedicines9050512.
- Tran, P., Weldemichael, T., Liu, Z., and Li, H.-Yu (2022) Delivery of oligonucleotides: efficiency with lipid conjugation and clinical outcome, *Pharmaceutics*, **14**, 342, doi: 10.3390/pharmaceutics14020342.
- Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., and Stetsenko, D. A. (2014) Phosphoryl guanidines: A new type of nucleic acid analogues, *Acta Naturae*, **6**, 116-118, doi: 10.32607/20758251-2014-6-4-116-118.
- Lomzov, A. A., Kupryushkin, M. S., Shernyukov, A. V., Nekrasov, M. D., Dovidenko, I. S., Stetsenko, D. A.,

- and Pyshnyi, D. V. (2019) Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: isolation and properties, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **513**, 807-811, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.024.
13. Miroshnichenko, S. K., Patutina, O. A., Burakova, E. A., Chelobanov, B. P., Fokina, A. A., Vlassov, V. V., Altman, S., Zenkova, M. A., and Stetsenko, D. A. (2019) Methyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 1229-1234, doi: 10.1073/pnas.1813376116.
14. Pavlova, A. S., Yakovleva, K. I., Epanchitseva, A. V., Kupryushkin, M. S., Pyshnaya, I. A., Pyshnyi, D. V., Ryabchikova, E. I., and Dovydenko, I. S. (2021) An influence of modification with phosphoryl guanidine combined with a 2'-O-methyl or 2'-fluoro group on the small-interfering-RNA effect, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9784, doi: 10.3390/ijms22189784.
15. Anderson, B. A., Freestone, G. C., Low, O., DeHoyos, C. L., Drury, III, W. J., Østergaard, M. E., Migawa, M. T., Fazio, M., Wan, W. B., Berdeja, A., Scandalis, E., Burel, S. A., Vickers, T. A., Crooke, S. T., Swayze, E. E., Liang, X., and Seth, P. P. (2021) Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 9026-9041, doi: 10.1093/nar/gkab718.
16. Kandasamy, P., Liu, Y., Aduda, V., Akare, S., Alam, R., Andreucci, A., Boulay, D., Bowman, K., Byrne, M., Cannon, M., Chivatakarn, O., Shelke, J. D., Iwamoto, N., Kawamoto, T., Kumarasamy, J., Lamore, S., Lemaitre, M., Lin, X., Longo, K., Looby, R., Marappan, S., Metterville, J., Mohapatra, S., Newman, B., Paik, I.-H., Patil, S., Purcell-Estabrook, E., Shimizu, M., Shum, P., Standley, S., Taborn, K., Tripathi, S., Yang, H., Yin, Y., Zhao, X., Dale, E., and Vargeese, S. (2022) Impact of guanidine-containing backbone linkages on stereopure antisense oligonucleotides in the CNS, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 5401-5423, doi: 10.1093/nar/gkac037.
17. Hall, J. (2023) Future directions for medicinal chemistry in the field of oligonucleotide therapeutics, *RNA*, **29**, 423-433, doi: 10.1261/rna.079511.122.
18. Godfrey, C., Desviat, L. R., Smedsrød, B., Piétri-Rouxel, F., Denti, M. A., Disterer, P., Lorain, S., Nogales-Gadea, G., Sardone, V., Anwar, R., Andaloussi, S. E., Lehto, T., Khoo, B., Brolin, C., van Roon-Mom, W. M. C., Goyenvall, A., Aartsma-Rus, A., and Arechavala-Gomez, V. (2017) Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies, *EMBO Mol. Med.*, **9**, 545-557, doi: 10.15252/emmm.201607199.
19. Gaus, H. J., Gupta, R., Chappell, A. E., Østergaard, M. E., Swayze, E. E., and Seth, P. P. (2019) Characterization of the interactions of chemically-modified therapeutic nucleic acids with plasma proteins using a fluorescence polarization assay, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 1110-1122, doi: 10.1093/nar/gky1260.
20. Lacroix, A., Fakih, H. H., and Sleiman, H. F. (2020) Detailed cellular assessment of albumin-bound oligonucleotides: Increased stability and lower non-specific cell uptake, *J. Control. Release*, **324**, 34-46, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.020.
21. Crooke, S. T., Seth, P. P., Vickers, T. A., and Liang, X.-H. (2020) The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 14754-14771, doi: 10.1021/jacs.0c04928.
22. Kim, W., Ly, N. K., He, Y., Li, Y., Yuan, Zh., and Yeo, Y. (2023) Protein corona: friend or foe? Co-opting serum proteins for nanoparticle delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **192**, 114635, doi: 10.1016/j.addr.2022.114635.
23. Chen, Z., Chen, X., Huang, J., Wang, J., and Wang, Z. (2022) Harnessing protein corona for biomimetic nanomedicine design, *Biomimetics*, **7**, 126, doi: 10.3390/biomimetics7030126.
24. Chernikov, I. V., Gladkikh, D. V., Meschaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G., Zenkova, M. A., et al. (2017) Cholesterol-containing nuclease-resistant siRNA accumulates in tumors in a carrier-free mode and silences *MDR1* gene, *Mol. Ther.*, **6**, 209-220, doi: 10.1016/j.omtn.2016.12.011.
25. Prakash, T. P., Mullick, A. E., Lee, R. G., Yu, J., Yeh, S. T., Low, A., Chappell, A. E., Østergaard, M. E., Murray, S., Gaus, H. J., Swayze, E. E., and Seth, P. P. (2019) Fatty acid conjugation enhances potency of antisense oligonucleotides in muscle, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 6029-6044, doi: 10.1093/nar/gkz354.
26. Benizri, S., Gissot, A., Martin, A., Vialet, B., Barthelemy, P., and Grinstaff, M. W. (2019) Bioconjugated oligonucleotides: recent developments and therapeutic applications, *Bioconjugate Chem.*, **30**, 366-383, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00761.
27. Kupryushkin, M. S., Zharkov, T. D., Ilina, E. S., Markov, O. V., Kochetkova, A. S., Akhmetova, M. M., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Lavrik, O. A., and Khodyreva, S. N. (2021) Triazinylamidophosphate oligonucleotides: synthesis and study of their interaction with cells and DNA-binding proteins, *Russ. J. Bioorganic Chem.*, **47**, 719-733, doi: 10.1134/S1068162021030110.
28. Brown, K. M., Nair, J. K., Janas, M. M., Anglero-Rodriguez, Y. I., Dang, L. T. H., Peng, H., Theile, C. S., Castellanos-Rizaldos, E., Brown, C., Foster, D., Kurz, J., Allen, J., Maganti, R., Li, J., Matsuda, S., Stricos, M., Chickering, T., Jung, M., Wassarman, K., Rollins, J., Woods, L., Kelin, A., Guenther, D. C.,

- Mobley, M. W., Petrusis, J., McDougall, R., Racie, T., Bombardie, J., Cha, D., Agarwal, S., Johnson, L., Jiang, Y., Lentini, S., Gilbert, J., Nguyen, T., Chigas, S., LeBlanc, S., Poreci, U., Kasper, A., Rogers, A. B., Chong, S., Davis, W., Sutherland, J. E., Castonero, A., Milstein, S., Schlegel, M. K., Zlatev, I., Charisse, K., Keating, M., Manoharan, M., Fitzgerald, K., Wu, J.-T., Maier, M. A., and Jadhav, V. (2022) Expanding RNAi therapeutics to extrahepatic tissues with lipophilic conjugates, *Nat. Biotechnol.*, **40**, 1500-1508, doi: 10.1038/s41587-022-01334-x.
29. Biscans, A., Caiazzzi, J., McHugh, N., Hariharan, V., Muhuri, M., and Khvorova, A. (2021) Docosanoic acid conjugation to siRNA enables functional and safe delivery to skeletal and cardiac muscles, *Mol. Ther.*, **29**, 1382-1394, doi: 10.1016/j.ymthe.2020.12.023.
30. Sarrett, S. M., Werfel, T. A., Lee, L., Jackson, M. A., Kilchrist, K. V., Brantley-Sieders, D., and Duvall, C. L. (2017) Lipophilic siRNA targets albumin in situ and promotes bioavailability, tumor penetration, and carrier-free gene silencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E6490-E6497, doi: 10.1073/pnas.1621240114.
31. Jin, C., Zhang, H., Zou, J., Liu, Y., Zhang, L., Li, F., Wang, R., Xuan, W., Ye, M., and Tan, W. (2018) Floxuridine homomeric oligonucleotides "Hitchhike" with albumin *in situ* for cancer chemotherapy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 8994-8997, doi: 10.1002/anie.201804156.
32. Chappell, A. E., Gaus, H. J., Berdeja, A., Gupta, R., Jo, M., Prakash, T. P., Oestergaard, E. E., Swayze, E. E., and Seth, P. P. (2020) Mechanisms of palmitic acid-conjugated antisense oligonucleotide distribution in mice, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 4382-4395, doi: 10.1093/nar/gkaa164.
33. Sleep, D. (2015) Albumin and its application in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **12**, 793-812, doi: 10.1517/17425247.2015.993313.
34. Hoogenboezem, E. N., and Duvall, C. L. (2018) Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **130**, 73-89, doi: 10.1016/j.addr.2018.07.011.
35. Varanko, A., Saha, S., and Chilkoti, A. (2020) Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **156**, 133-187, doi: 10.1016/j.addr.2020.08.008.
36. Prajapati, R., and Somoza, Á. (2021) Albumin nanostructures for nucleic acid delivery in cancer: current trend, emerging issues, and possible solutions, *Cancers*, **13**, 3454, doi: 10.3390/cancers13143454.
37. Chubarov, A. S. (2022) Serum albumin for magnetic nanoparticles coating, *Magnetochemistry*, **8**, 13, doi: 10.3390/magnetochemistry8020013.
38. Hu, H., Quintana, J., Weissleder, R., Parangi, S., and Miller, M. (2022) Deciphering albumin-directed drug delivery by imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **185**, 114237, doi: 10.1016/j.addr.2022.114237.
39. Merlot, A. M., Kalinowski, D. S., and Richardson, D. R. (2014) Unraveling the mysteries of serum albumin – more than just a serum protein, *Front. Physiol.*, **5**, 299, doi: 10.3389/fphys.2014.00299.
40. Zhao, P., Wang, Y., Wu, A., Rao, Y., and Huang, Y. (2018) Roles of albumin-binding proteins in cancer progression and biomimetic targeted drug delivery, *ChemBioChem*, **19**, 1796-1805, doi: 10.1002/cbic.201800201.
41. Thelu, H. V. P., Atchimnaidu, S., Perumal, D., Hari Krishnan, K. S., Vijayan, S., and Varghese, R. (2019) Self-assembly of an aptamer-decorated, DNA-protein hybrid nanogel: a biocompatible nanocarrier for targeted cancer therapy, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2**, 5227-5234, doi: 10.1021/acsabm.9b00323.
42. Huang, J., Ma, W., Sun, H., Wang, H., He, X., Cheng, H., Huang, M., Lei, Y., and Wang, K. (2020) Self-assembled DNA nanostructures-based nanocarriers enabled functional nucleic acids delivery, *ACS Appl. Bio Mater.*, **3**, 2779-2795, doi: 10.1021/acsabm.9b01197.
43. Harris, M. A., Kuang, H., Schneiderman, Z., Shiao, M. L., Crane, A. T., Chrostek, M. R., Tăbăran, A.-F., Pengo, T., Liaw, K., Xu, B., Lin, L., Chen, C. C., O'Sullivan, M. G., Kannan, R., Low, W. C., and Kokkoli, E. (2021) ssDNA nanotubes for selective targeting of glioblastoma and delivery of doxorubicin for enhanced survival, *Sci. Adv.*, **7**, eabl5872, doi: 10.1126/sciadv.abl5872.
44. Liu, J., Chen, L., Zhai, T., Li, W., Liu, Y., and Gu, H. (2022) Programmable assembly of amphiphilic DNA through controlled cholesterol stacking, *J. Am. Chem. Soc.*, **144**, 16598-16603, doi: 10.1021/jacs.2c06610.
45. Ma, W., Zhan, Y., Zhang, Y., Mao, C., Xie, X., and Lin, Y. (2021) The biological applications of DNA nanomaterials: current challenges and future directions, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **6**, 351, doi: 10.1038/s41392-021-00727-9.
46. Li, J., Zheng, C., Cansiz, S., Wu, C., Xu, J., Cui, C., Liu, Y., Hou, W., Wang, Y., Zhang, L., Teng, I.-T., Yang, H.-H., and Tan, W. (2015) Self-assembly of DNA nanohydrogels with controllable size and stimuli-responsive property for targeted gene therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 1412-1415, doi: 10.1021/ja512293f.
47. Raniolo, S., Unida, V., Vindigni, G., Stolfi, C., Iacovelli, F., Desideri, A., and Biocca, S. (2021) Combined and selective miR-21 silencing and doxorubicin delivery in cancer cells using tailored DNA nanostructures, *Cell Death Dis.*, **12**, 7, doi: 10.1038/s41419-020-03339-3.
48. Wang, Y., Cheng, J., Zhao, D., Liu, Y., Luo, T., Zhong, Y.-F., Mo, F., Kong, X.-Y., and Song, J. (2020) Designed DNA nanostructure grafted with erlotinib for non-small-cell lung cancer therapy, *Nanoscale*, **12**, 23953, doi: 10.1039/d0nr06945k.

49. Wang, H., Xiao, H., Zhu, X., Liu, Y., Fu, Z., Li, C., Lu, C., and Yang, H. (2021) A cyanine-mediated self-assembly system for the construction of a two-in-one nanodrug, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **60**, 21226–21230, doi: 10.1002/anie.202108393.
50. Markov, O. V., Filatov, A. V., Kupryushkin, M. S., Chernikov, I. V., Patutina, O. A., Strunov, A. A., Chernolovskaya, E. L., Vlassov, V. V., Pyshnyi, D. V., and Zenkova, M. A. (2020) Transport oligonucleotides – a novel system for intracellular delivery of antisense therapeutics, *Molecules*, **25**, 3663, doi: 10.3390/molecules25163663.
51. Pavlova, A. S., Dovydenko, I. S., Kupryushkin, M. S., Grigor'eva, A. E., Pyshnaya, I. A., and Pyshnyi, D. V. (2020) Amphiphilic “like-a-brush” oligonucleotide conjugates with three dodecyl chains: self-assembly features of novel scaffold compounds for nucleic acids delivery, *Nanomaterials*, **10**, 1948, doi: 10.3390/nano10101948.
52. Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., and Ascenzi, P. (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life*, **57**, 787–796, doi: 10.1080/15216540500404093.
53. Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., and Ascenzi, P. (2012) Human serum albumin: from bench to bedside, *Mol. Aspects Med.*, **33**, 209–290, doi: 10.1016/j.mam.2011.12.002.
54. Knudsen Sand, K. M., Bern, M., Nilsen, J., Noordzij, H. T., Sandlie, I., and Andersen, J. T. (2015) Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albumin-based therapeutics, *Front. Immunol.*, **5**, 682, doi: 10.3389/fimmu.2014.00682.
55. Kupryushkin, M. S., Nekrasov, M. D., Stetsenko, D. A., and Pyshnyi, D. V. (2014) Efficient functionalization of oligonucleotides by new achiral non-nucleosidic monomers, *Org. Lett.*, **16**, 2842–2845, doi: 10.1021/ol500668n.
56. Dunn, D. B., and Hall, R. H. (1975) Purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides: physical constants and spectral properties, in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (Fasman, G. D., eds) CRC Press, Cleveland, Vol. 1, pp. 65–215.
57. Dobrynin, S., Kutseikin, S., Morozov, D., Krumkacheva, O., Spitsyna, A., Gatilov, Y., Silnikov, V., Angelovski, G., Bowman, M. K., Kirilyuk, I., and Chubarov, A. (2020) Human serum albumin labelled with sterically-hindered nitroxides as potential MRI CONTRAST Agents, *Molecules*, **25**, 1709, doi: 10.3390/molecules25071709.
58. Chubarov, A., Spitsyna, A., Krumkacheva, O., Mitin, D., Suvorov, D., Tormyshev, V., Fedin, M., Bowman, M. K., and Bagryanskaya, E. (2021) Reversible dimerization of human serum albumin, *Molecules*, **26**, 108, doi: 10.3390/molecules26010108.
59. Atmeh, R. F., Arafa, I. M., and Al-Khateeb, M. (2007) Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physico-chemical properties, *Jordan J. Chem.*, **2**, 169–182.
60. Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., and Peek, A. S. (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers, *Nucleic Acids Res.*, **36**, W163–W169, doi: 10.1093/nar/gkn198.
61. Alinovskaya, L. I., Sedykh, S. E., Ivanisenko, N. V., Soboleva, S. E., and Nevinsky, G. A. (2018) How human serum albumin recognizes DNA and RNA, *Biol. Chem.*, **399**, 347–360, doi: 10.1515/hsz-2017-0243.
62. Bar-Ziv, R., and Libchaber, A. (2001) Effects of DNA sequence and structure on binding of RecA to single-stranded DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9068–9073, doi: 10.1073/pnas.15124289.
63. Fredrickson, D. S., and Gordon, R. S. (1958) The metabolism of albumin-bound C14-labeled unesterified fatty acids in normal human subjects, *J. Clin. Invest.*, **37**, 1504–1515, doi: 10.1172/JCI103742.
64. Peters, Jr., T. (1995) *All about Albumin. Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, doi: 10.1016/B978-0-12-552110-9.X5000-4.
65. Bhattacharya, A. A., Grüne, T., and Curry, S. (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin, *J. Mol. Biol.*, **303**, 721–732, doi: 10.1006/jmbi.2000.4158.
66. Curry, S. (2003) Plasma albumin as a fatty acid carrier, in *Advances in Molecular and Cell Biology, Lipobiology* (van der Vusse, G. J., eds) Elsevier, vol. 33, pp. 29–46.
67. Fujiwara, S.-i., and Amisaki, T. (2008) Identification of high affinity fatty acid binding sites on human serum albumin by MM-PBSA method, *Biophys. J.*, **94**, 95–103, doi: 10.1529/biophysj.107.111377.
68. Van der Vusse, G. J. (2009) Albumin as fatty acid transporter, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 300–307, doi: 10.2133/dmpk.24.300.
69. Ascenzi, P., Bocedi, A., Notari, S., Fanali, G., Fesce, R., and Fasano, M. (2006) Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin, *Mini. Rev. Med. Chem.*, **6**, 483–489, doi: 10.2174/138955706776361448.
70. Agudelo, D., Bourassa, P., Bruneau, J., Bérubé, G., Asselin, É., and Tajmir-Riahi, H.-A. (2012) Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and N-(trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins, *PLoS One*, **7**, e43814, doi: 10.1371/journal.pone.0043814.
71. Golianová, K., Havadej, S., Verebová, V., Uličný, J., Holečková, B., and Staničová, J. (2021) Interaction of conazole pesticides epoxiconazole and prothioconazole with human and bovine serum albumin studied using spectroscopic methods and molecular modeling, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1925, doi: 10.3390/ijms22041925.

72. Bisker, G., Ahn, J., Kruss, S., Ulissi, Z. W., Salem, D. P., and Strano, M. S. (2015) A mathematical formulation and solution of the CoPhMoRe inverse problem for helically wrapping polymer corona phases on cylindrical substrates, *J. Phys. Chem. C*, **119**, 13876-13886, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b01705.
73. Beckwitt, E., Kong, M., and Van Houten, B. (2018) Studying protein–DNA interactions using atomic force microscopy, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **73**, 220-230, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.06.028.
74. Pyshnaya, I. A., Pyshnyi, D. V., Lomzov, A. A., Zarytova, V. F., and Ivanova, E. M. (2004) The influence of the non-nucleotide insert on the hybridization properties of oligonucleotides, *Nucleosides Nucleic Acids*, **23**, 1065-1071, doi: 10.1081/NCN-200026073.
75. Виноградова О. А., Еремеева Е. В., Ломзов А. А., Пышная И. А., Пышный Д. В. (2009) Изогнутые дцДНК с заданными геометрическими характеристиками на основе комплексов мостиковых олигонуклеотидов, *Биоорг. химия*, **35**, 384-396.
76. Виноградова О. А., Щеглов Д. В., Латышев А. В., Пышный Д. В. (2011) Изучение структурной организации конкатемерных комплексов на основе нативных и модифицированных дцДНК-блоков, *Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина*, **9**, 109-117.
77. Pyne, A. L. B., Noy, A., Main, K. H. S., Velasco-Berrelleza, V., Piperakis, M. M., Mitchenall, L. A., Cugliandolo, F. M., Beton, J. G., Stevenson, C. E. M., Hoogenboom, B. W., Bates, A. D., Maxwell, A., and Harris, S. A. (2021) Base-pair resolution analysis of the effect of supercoiling on DNA flexibility and major groove recognition by triplex-forming oligonucleotides, *Nat. Commun.*, **12**, 1053, doi: 10.1038/s41467-021-21243-y.
78. Zhang, W., and Tung, C.-H. (2017) Sequence-independent DNA nanogel as a potential drug carrier, *Macromol. Rapid Commun.*, **38**, 1700366, doi: 10.1002/marc.201700366.
79. Lacroix, A., Edwardson, T. G. W., Hancock, M. A., Dore, M. D., and Sleiman, H. F. (2017) Development of DNA nanostructures for high-affinity binding to human serum albumin, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 7355-7362, doi: 10.1021/jacs.7b02917.
80. Arabi, S. H., Aghelnejad, B., Schwieger, C., Meister, A., Kerth, A., and Hinderberger, D. (2018) Serum albumin hydrogels in broad pH and temperature ranges: characterization of their self-assembled structures and nanoscopic and macroscopic properties, *Biomater. Sci.*, **6**, 478, doi: 10.1039/c7bm00820a.

COMPLEXES AND SUPRAMOLECULAR ASSOCIATES OF DODECYL-CONTAINING OLIGONUCLEOTIDES WITH SERUM ALBUMIN

A. S. Pavlova*, V. V. Ilyushchenko, M. S. Kupryushkin, T. D. Zharkov, E. S. Dyudeeva,
I. A. Bauer, A. S. Chubarov, D. V. Pyshnyi, and I. A. Pyshnaya*

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: pyshnaya@niboch.nsc.ru, pavlova@niboch.nsc.ru*

Serum albumin is currently in the focus of biomedical research as a promising platform for the creation of multicomponent self-assembling systems due to the presence of several sites with a high binding affinity of various compounds in its molecule, including lipophilic oligonucleotide conjugates. In this work, we investigated the stoichiometry of the dodecyl-containing oligonucleotides binding to bovine and human serum albumins via electrophoretic mobility shift assay. The results testify to the formation of albumin-oligonucleotide complexes with a stoichiometry of about 1 : (1.25 ± 0.25) under physiological-like conditions. Using atomic force microscopy, it was found that interaction of human serum albumin with a duplex of complementary dodecyl-containing oligonucleotides resulted in associates of round shape with a diameter of 165.5 ± 94.3 nm and 28.9 ± 16.9 nm in height, and with polydeoxyadenylic acid and dodecyl-containing oligothymidylate also resulted in formation of supramolecular associates with a size of about 315.4 ± 70.9 and 188.3 ± 43.7 nm. The obtained data allow considering dodecyl-containing oligonucleotides and albumin as potential components for the development of methods to design self-assembled systems for solving problems of molecular biology, biomedicine, and the development of unique theranostics with targeted action.

Keywords: serum albumin, dodecyl-containing oligonucleotides, protein-nucleic acids complexes, biopolymers self-assembly, supramolecular associates, nucleic acids delivery