

УДК 577.2

ВЫБОР АМИНОКИСЛОТНОГО САЙТА С ОДНОЙ ИЗ САМЫХ БЫСТРЫХ КИНЕТИК РАСЩЕПЛЕНИЯ ЭНДОСОМНОЙ ПРОТЕАЗОЙ КАТЕПСИНОМ В ДЛЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ В СИСТЕМАХ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

© 2023 г. Ю. В. Храмов^{1,**}, академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,*}

Поступило 21.11.2022 г.

После доработки 17.12.2022 г.

Принято к публикации 19.12.2022 г.

На основании известных литературных данных были выбраны шесть пептидных последовательностей, которые потенциально способны быстро расщепляться эндосомной протеазой катепсином В. Для сравнения изучалось также расщепление катепсином В распространенных линкерных последовательностей – полиглицина и полиглицин-серина. Разные концы данных пептидов были помечены флуоресцентными красителями sulfoCyanine3 и sulfoCyanine5, между которыми возможен резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET). Кинетика расщепления пептидов катепсином В изучалась на мультимодальном плащечном ридере по уменьшению сигнала FRET. Было показано, что для потенциального использования в различных системах доставки лекарств наиболее подходящими являются сайты расщепления FKFL и FRRG. Данные сайты значительно эффективнее расщепляются в слабых условиях эндосом, чем при нейтральных значениях pH, характерных для внеклеточной среды.

Ключевые слова: сайты расщепления протеазами, катепсин В, FRET, pH зависимость

DOI: 10.31857/S2686738923700166, **EDN:** NBOJNC

Многие высокомолекулярные биоактивные вещества не способны самостоятельно проникать в клетки-мишени, поэтому для их проникновения обычно используются различные системы доставки [1, 2]. Для попадания доставляемого вещества в цитозоль необходимо, чтобы оно вышло из эндосом [1, 2]. При этом отщепление в эндосомах доставляемого вещества от системы доставки потенциально может заметно улучшить попадание этого вещества в цитозоль [3]. Примером протеазы, которую можно использовать для этих целей, является катепсин В, который многие вирусы используют для активации поверхностных белков для выхода этих вирусов из эндосом [4]. Специфичность и эффективность данной протеазы сильно зависят от pH среды. В литературе известен целый ряд аминокислотных сайтов, которые могут расщепляться катепсином В при слабых pH эндосом, но не расщепляться или

слабо расщепляться при нейтральных значениях pH, характерных для внеклеточной среды. Примером таких сайтов могут служить: FKFL [3], GFLG [5], FRRG [6], HRFR [7], EGEF [8] и AVGGAG [9]. Однако система доставки находится в эндосомах относительно недолго, поэтому скорость расщепления выбранного сайта должна быть максимально возможной. В то время как по литературным данным не представляется возможности сравнить кинетику расщепления разных сайтов в одних и тех же условиях. Это было сделано в настоящей работе, что позволило выбрать наиболее оптимальные сайты расщепления катепсином В. В полипептидных системах доставки, таких, например, как разработанных нами модульных нанотранспортерах [2, 10], могут использоваться различные аминокислотные линкеры, например, полиглицин и полиглицин-серин. Чтобы узнать, способен ли катепсин В расщеплять эти линкеры, в данной работе также были выбраны пептиды GGGG и GSGS. Кинетика расщепления этих пептидов интересна еще и потому, что катепсин В потенциально способен расщеплять связь глицин-глицин [9]. Для изучения кинетики расщепления выбранных пептидов они были мечены с обеих концов флуоресцентными красителями sulfo-Cyanine3 и sulfo-Cyanine5,

¹ Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: alsobolev@yandex.ru

**E-mail: ykhram2000@mail.ru

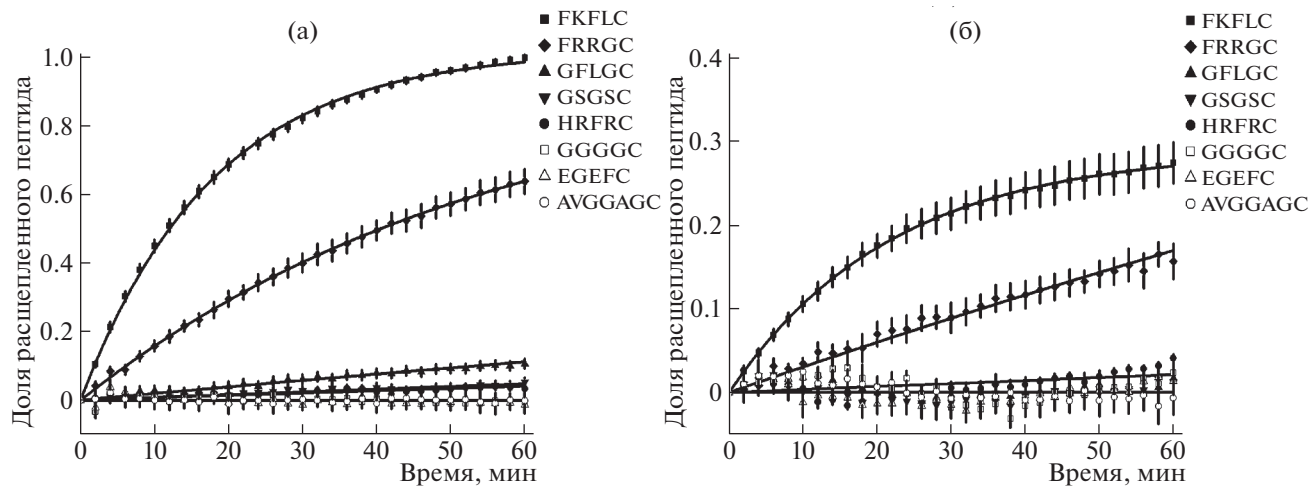


Рис. 1. Кинетика расщепления различных пептидов (20 мкМ) катепсином В (1 мкг/мл) при pH 6.0 (а) и 7.5 (б). Указана среднеквадратичная ошибка доли расщепленного пептида (3–9 повторов).

между которыми может происходить резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET). Уменьшение сигнала FRET говорило о расщеплении пептида.

Пептиды FKFLC, GFLGC, FRRGC, HRFRC, EGEFC, AVGGAGC, GGGGC и GSGSC были получены химическим синтезом на заказ (Elabscience Biotechnology Inc., США) с чистотой $\geq 95\%$. В буфере 10 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl, pH 7.0 к 400 мкМ пептида добавляли 800 мкМ sulfo-Сyanine3 активированный эфир и 800 мкМ sulfo-Сyanine5 малеимид. Инкубировали 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Измерение сигнала FRET проводили в плашках Costar 96 с черными стенками на мультимодальном ридере ClarioStar (BMG LABTECH, Германия) при длине возбуждения 485 нм и длине флуоресценции 715 нм, ширина оптической щели 15 нм. Пептид разводился в буфере 20 мМ HEPES, 20 мМ MES, 20 мМ цитрат натрия, 110 мМ NaCl с разными значениями pH до конечной концентрации 20 мкМ. Для расщепления использовался катепсин В (Native human Cathepsin B protein (ab90387, Abcam)) в концентрации 1 мкг/мл. Перед применением катепсин В активировался, как описано в [3]. Измерение снижения интенсивности сигнала FRET проводили до 1 ч с периодичностью 2 мин. Эксперименты повторяли от 3 до 9 раз. В качестве контроля были получены данные по кинетике изменения сигнала FRET для образцов (три повтора), к которым не был добавлен катепсин В (максимальный уровень сигнала FRET), а также данные по кинетике изменения сигнала FRET для образцов, не содержащих пептид, а только флуоресцентные красители sulfo-Сyanine3 и sulfo-Сyanine5 в соответствующей концентрации (нулевой уровень). Это позволило для каждого пептида рассчитать его

долю, подвергшуюся расщеплению для соответствующих значений pH и времен. По зависимости доли расщепленного пептида от времени, t , была рассчитана константа скорости расщепления, k , путем интерполяции данных кривых зависимостью $1 - \exp(-k \times t)$.

На рис. 1 представлены данные по кинетике расщепления пептидов FKFLC, FRRGC, GFLGC, GSGSC, HRFRC, GGGGC, EGEFC и AVGGAGC катепсином В при pH 6.0 и 7.5, которые, как считается [9], отвечают pH эндосом и внеклеточного пространства. При pH 6.0 значения k составляют $0.057 \pm 0.004 \text{ мин}^{-1}$, $0.0173 \pm 0.0016 \text{ мин}^{-1}$, $0.00198 \pm 0.00012 \text{ мин}^{-1}$, $0.00081 \pm 0.00011 \text{ мин}^{-1}$ и $0.00073 \pm 0.00005 \text{ мин}^{-1}$ для пептидов FKFLC, FRRGC, GFLGC, GSGSC и HRFRC соответственно. Для пептидов GGGGC, EGEFC и AVGGAGC расщепления в данном временном интервале не наблюдалось (рис. 1а). При pH 7.5 доля расщепленного пептида была в несколько раз меньше, чем при pH 6.0 (рис. 1). При pH 7.5 значения k составляют $0.0068 \pm 0.0007 \text{ мин}^{-1}$, $0.0031 \pm 0.0004 \text{ мин}^{-1}$ и $0.00026 \pm 0.00013 \text{ мин}^{-1}$ для пептидов FKFLC, FRRGC и HRFRC соответственно. Для остальных пептидов при этом pH расщепления не наблюдалось (рис. 1б).

Для пептидов FKFLC и FRRGC, лучше всего подверженных расщеплению катепсином В, были получены более подробные зависимости значения k от pH буфера (рис. 2). По этим зависимостям видно, что эффективность расщепления данных пептидов возрастает по мере уменьшения pH буфера (рис. 2). Иными словами, данные сайты будут эффективнее расщепляться в поздних эндосомах (pH 5.5), чем в ранних эндосомах (pH 6.0).

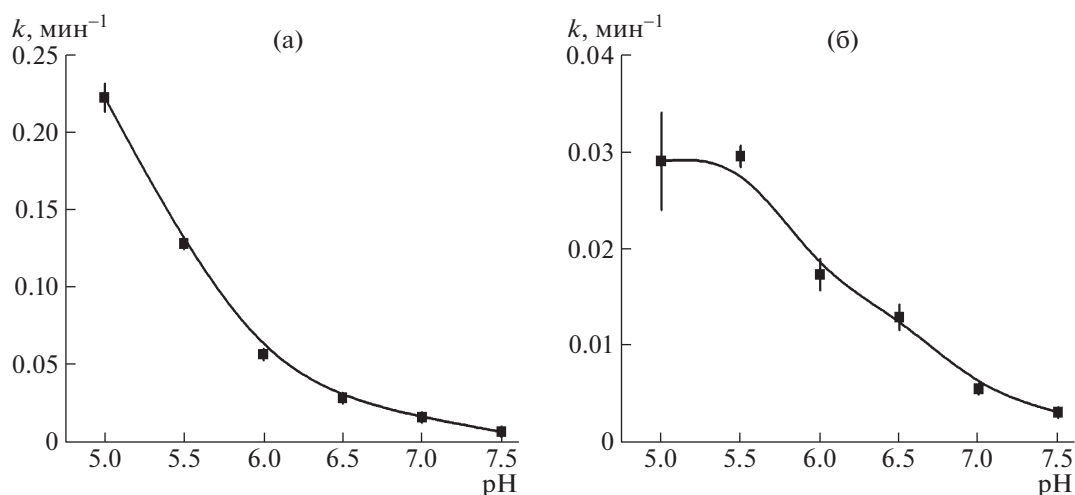


Рис. 2. Зависимость константы скорости расщепления, k , пептида (20 мкМ) FKFLC (а) и FRRGC (б) катепсином В (1 мкг/мл) от рН буфера. Указана среднеквадратичная ошибка константы k (3–9 повторов).

Таким образом, из восьми потенциальных сайтов расщепления катепсином В наиболее перспективными для расщепления в эндосомах являются сайты FKFL и FRRG. Эффективность их расщепления возрастает по мере уменьшения рН с 7.5 до 5. Для использования в системах доставки, нацеленных на нормальные клетки, лучше всего подходит сайт FKFL. Если доставка требуется в опухолевые клетки, то из-за сверхэкспрессии катепсина В в этих клетках [11] наиболее перспективным может оказаться сайт FRRG, т.к. он будет лучше расщепляться в опухолевых клетках, по сравнению с нормальными. Кроме того, известно, что некоторая доля катепсина В попадает во внеклеточное пространство [11], а в опухолях часто происходит закисление внеклеточной среды до рН 6.8 [12]. В этих условиях отщепление доставляемой молекулы от системы доставки может происходить раньше времени, тем самым снижая концентрацию этой молекулы в клетке-мишени. Учитывая, что при слабых рН эффективность ферментативного расщепления сайта FRRG значительно меньше, чем сайта FKFL (рис. 2), для использования в системах доставки в опухолевые клетки он может оказаться предпочтительнее сайта FKFL.

В результате проведенной работы нами было продемонстрировано, что при слабых рН условиях эндосом лучше всего расщепляются сайты FKFL и FRRG, в то время как при нейтральных рН эффективность расщепления этих сайтов значительно снижается. Данные сайты можно включить в состав выбранной системы доставки биологически активных веществ для потенциального увеличения эффективности их доставки в заданный компартмент клетки.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-24-00035). Эксперименты были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu G., Yang L., Chen G., et al. // *Front Pharmacol.* 2021. V. 12. 735446.
2. Sobolev A.S. // *Front Pharmacol.* 2018. V. 9. 952.
3. Kern H.B., Srinivasan S., Convertine A.J., et al. // *Mol Pharmaceutics.* 2017. V. 14. № 5. P. 1450–1459.
4. Bottcher-Friebertshauer E., Garten W., Klenk H.D. // *Activation of viruses by host proteases.* 2018. Springer. 337 p.
5. Jin X., Zhang J., Jin X., et al. // *ACS Med Chem Lett.* 2020. V. 11. № 8. P. 1514–1520.
6. Shim M.K., Park J., Yoon H.Y., et al. // *J Contr Rel.* 2019. V. 294. P. 376–389.
7. Poreba M., Rut W., Vizovisek M., Groborz K., et al. // *Chem Sci.* 2018. V. 9. P. 2113–2129.
8. Jordans S., Jenko-Kokalj S., Kuhl N.M., et al. // *BMC Biochemistry.* 2009. V. 10, 23.
9. Binossek M.L., Nagler D.K., Becker-Pauly C., et al. // *J. Proteome Res.* 2011. V. 10. P. 5363.
10. Khrantsov Y.V., Vlasova A.D., Vlasov A.V., et al. // *Acta Cryst.* 2020. V. D76. P. 1270–1279.
11. Aggarwal N., Sloane B.F. // *Proteomics Clin Appl.* 2014. V. 8. P. 427–437.
12. Zhang X., Lin Y., Gillies R.J. // *J Nucl Med.* 2010. V. 51. P. 1167–1170.

SELECTION OF AN AMINO ACID SITE WITH ONE OF THE FASTEST CLEAVAGE KINETICS BY THE ENDOSOMAL PROTEASE CATHEPSIN B FOR POTENTIAL USE IN DRUG DELIVERY SYSTEMS

**Y. V. Khramtsov^a, Academician of the RAS G. P. Georgiev^a,
and Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev^{a,b,#}**

^a *Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

^b *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

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

Based on known literature data, six peptide sequences were selected that are potentially capable of being rapidly cleaved by the endosomal protease cathepsin B. For comparison, cathepsin B cleavage of common linker sequences, polyglycine and polyglycine-serine, was also studied. Different ends of these peptides were labeled with sulfoCyanine3 and sulfoCyanine5 fluorescent dyes, between which Förster resonant energy transfer (FRET) is possible. The kinetics of cleavage of peptides by cathepsin B was studied on a multimodal plate reader by FRET signal reduction. FKFL and FRRG cleavage sites have been shown to be the most suitable for potential use in various drug delivery systems. These sites are much more efficiently cleaved under slightly acidic conditions of endosomes than at neutral extracellular pH.

Keywords: protease cleavage sites, cathepsin B, FRET, pH dependence