

РАЗРАБОТКА И СИНТЕЗ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА БОМБЕЗИНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КНОТТИНА

DOI: 10.17691/stm2024.16.2.01

УДК 615.2:577.112.6

Поступила 26.09.2023 г.



Е.А. Белобородов, научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;
Е.В. Юрова, младший научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;
А.Н. Фомин, к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин; директор Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы;
Ю.В. Саенко, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы

Ульяновский государственный университет, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновск, 432017

Бомбезиновые рецепторы на клеточной поверхности представляют большой интерес в качестве мишени для таргетной терапии рака. Одна из стратегий воздействия на бомбезиновые рецепторы связана с использованием тропных коротких пептидов. Однако основным ограничением для широкого применения пептидов в качестве лекарств является их низкая стабильность *in vivo* вследствие чувствительности к экстремальным условиям внутренней среды организма, таким как температура и действие ферментов. В нашей работе мы взяли за основу короткий пептид — бомбезин, который модифицировали с использованием кноттина — токсина с цистиновым ингибиторным узлом, за счет чего повысили стабильность короткого пептида в различных условиях.

Цель исследования — изучить химическую и радиохимическую стабильность структуры на основе короткого пептида бомбезина и токсина кноттина, а также способность полученной конструкции связываться с целевыми опухолевыми клетками.

Материалы и методы. Анализировали химическую и радиохимическую стабильность синтезированного пептида, меченного радиоизотопом лютеция, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для анализа связывания с культурами, экспрессирующими бомбезиновые рецепторы, применяли флуоресцентно-меченый пептид, который был получен в результате твердофазного пептидного синтеза. Для модификации этого пептида использовали токсин с цистиновым ингибиторным узлом — кноттин.

Результаты. В результате анализа отмечены повышенная химическая и радиохимическая стабильность пептида, модифицированного кноттином, в сравнении с коммерческим аналогом и сохранение высокой способности данной структуры связываться с рецепторами на поверхности опухолевых клеток.

Заключение. Созданная на основе короткого пептида бомбезина и кноттина конструкция обладает повышенной стабильностью, при этом сохраняет способность связываться с раковыми клетками. Все это позволяет рассматривать создание таких конструкций в качестве стратегии для изготовления стабилизирующего каркаса для коротких пептидов при пептид-рецепторной терапии.

Ключевые слова: бомбезин; кноттин; таргетная терапия; пептидный токсин; бомбезиновый рецептор.

Как цитировать: Beloborodov E.A., Iurova E.V., Fomin A.N., Saenko Yu.V. Development and synthesis of bombesin-based radiopharmaceutical precursors modified with knottin. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(2): 5, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.2.01>

Для контактов: Саенко Юрий Владимирович, e-mail: saenko@yandex.ru

Development and Synthesis of Bombesin-Based Radiopharmaceutical Precursors Modified with Knottin

E.A. Beloborodov, Researcher, Laboratory for Peptide Drugs and Vaccines Development, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology;

E.V. Iurova, Junior Researcher, Laboratory for Peptide Drugs and Vaccine Development, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology;

A.N. Fomin, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Peptide Drugs and Vaccines Development, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology;

Yu.V. Saenko, DSc, Leading Researcher, Laboratory for Peptide Drugs and Vaccines Development, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology

Ulyanovsk State University, 42 Leo Tolstoy St., Ulyanovsk, 432017, Russia

Bombesin receptors on the cell surface are of great interest as a target for targeted cancer therapy. One of the strategies of targeting bombesin receptors involves the use of tropic short peptides. However, the main limitation for the wide application of peptides as drugs is their low stability *in vivo* due to their sensitivity to extreme conditions of the internal body environment such as temperature and action of enzymes. In our work, a short bombesin peptide, taken as a basis, was modified with a knottin, a toxin with an inhibitor cystine knot, increasing thereby the stability of the short peptide under various conditions.

The aim of the investigation is to study the chemical and radiochemical stability of the structure based on the short bombesin peptide and knottin, as well as the ability of the obtained structure to bind to tumor cells.

Materials and Methods. The work analyzed the chemical and radiochemical stability of the synthesized peptide labeled with a lutetium radioisotope using high-performance liquid chromatography. A fluorescent-labeled peptide, obtained by a solid-phase peptide synthesis, was used to analyze binding to cultures expressing bombesin receptors.

Results. The analysis has shown increased chemical and radiochemical stability of the knottin-modified peptide, as compared to the commercial analog, and maintenance of a high ability to bind to receptors on the surface of cancer cells.

Conclusion. The structure created on the basis of a short bombesin peptide and knottin possesses increased stability and retains the ability to bind to cancer cells. All this allows us to consider the creation of these structures as a strategy for fabricating stabilizing scaffolds for short peptides for a peptide-receptor therapy.

Key words: bombesin; knottin; targeted therapy; peptide toxin; bombesin receptor.

Введение

Пептид-рецепторная радионуклидная терапия представляет собой молекулярно-направленную лучевую терапию, включающую системное введение радиоактивно-меченого пептида, предназначенного для воздействия на рецепторы на поверхности опухолевых клеток [1]. Самым крупным классом рецепторов, которые в значительной степени экспрессируются при онкологических заболеваниях, являются рецепторы, связанные с G-белком (гастрин-высвобождающие пептидные рецепторы (gastrin-releasing peptide receptors, GRPR)). Этот класс включает более восьмисот рецепторов, имеющих общую структуру из семи трансмембранных спиралей, которые связаны тремя внутри- и тремя внеклеточными петлевыми областями, внеклеточным N-концом и внутриклеточным карбоксил-концевым доменом [2]. К классу GRPR-рецепторов также относят и семейство бомбезиновых рецепторов [3]. Рецепторы бомбезина широко распространены в организме млекопитающих. Их активация вызывает ши-

рокий спектр физиологических реакций: стимуляцию роста нормальных и неопластических тканей, сокращение гладких мышц, пищевое поведение, секрецию и многие эффекты центральной нервной системы, включая регуляцию циркадного ритма [4, 5]. Однако рецепторы бомбезина привлекли внимание исследователей в первую очередь из-за их экспрессии при различных видах рака [6]. Они часто экспрессируются в значительных количествах на клетках опухолей молочной железы, предстательной железы, рака толстой кишки, легких, нейроblastомы и других [7–13]. В связи с этим пептид-рецепторная терапия, направленная на рецепторы бомбезина, может служить перспективной основой для лечения широкого спектра онкологических заболеваний.

В основе одной из стратегий, нацеленных на воздействие на бомбезиновые рецепторы, лежит использование тропных коротких пептидов. К ним можно отнести амидированный тетрадекапептид, названный бомбезином по названию лягушки *Bombina bombina*, из кожи которой он был выделен еще в 1972 г.

V. Erspamer и его коллегами [14]. Позже бомбезин-подобные пептиды были обнаружены и у млекопитающих. Из спинного мозга свиньи выделили бомбезин-подобный пептид 1 — BB1 (декапептид нейромедин В, NMB), встречающийся в формах-предшественниках из 30 и 32 аминокислот. Концевые карбоксильные группы NMB идентичны бомбезину, за исключением группы замены валина на треонин в NMB [15]. Из желудка свиньи был выделен бомбезин-подобный пептид 2 — BB2 (гастрин-высвобождающий пептид, GRP) из 27 аминокислот, имеющий те же 7 карбоксильных концевых аминокислот, что и бомбезин, которые обеспечивают схожую биологическую активность [16]. Наконец, был открыт бомбезин-подобный рецептор 3 — BRS3, также известный как рецептор бомбезина подтипа 3, который, однако, на данный момент изучен слабо и для которого не обнаружен природный лиганд [17].

В своей работе мы создали новую, не встречающуюся в природе пептидную конструкцию на основе токсина кноттина, способную к целевому связыванию с бомбезиновым рецептором на поверхности раковых клеток. За основу взяли короткий пептид бомбезин, выделенный из кожи лягушки *B. bombina*, который модифицировали с использованием токсина с цистеиновым ингибиторным узлом. К данному классу токсинов относятся в первую очередь токсины из яда беспозвоночных, одной из отличительных особенностей которых является повышенная протеолитическая и термическая стабильность. В нашем случае был выбран токсин кноттин — U5-scytotoxin-Sth1a (UniProt: U51A_SCYTH) из паука *Scytodes thoracica*. Выбранный короткий пептид был помещен в положение между первым и вторым цистеиновыми остатками, в связи с чем новая структура получила название BBN/C1-C2. В нашем предыдущем исследовании [18] при работе с пептидом, тропным к протатспецифическому мембранному антигену (PSMA), мы показали эффективность данной стратегии.

Помимо пептидной части в пептид-рецепторной радионуклидной терапии важен выбор радиоизотопа, активность распада которого улавливается в случае визуализации опухоли и обеспечивает уничтожение опухолевых клеток в случае лечения. Одним из перспективных изотопов для использования в радиофармпрепаратах является лютеций. Он имеет короткий период полураспада — около 7 дней, что служит достаточно долгим периодом для транспортировки и хранения, но достаточно коротким, чтобы защитить организм от накопления высоких доз радиации. Лютеций является бета- и гамма-излучателем, что позволяет использовать его как для терапии, так и для визуализации. Энергия бета-частиц обеспечивает идеальное проникновение в мягкие ткани на глубину 670 мкм, достаточную для уничтожения опухолевой клетки, но недостаточную для негативного воздействия на окружающие ткани [19].

Важную роль в пептид-рецепторной радионуклидной терапии играет хелатор, входящий в со-

став радиофармпрепарата и обеспечивающий связь радиоизотопа с пептидной конструкцией. В нашей работе в качестве радиоизотопа был использован хлорид лютеция ^{177}Lu . Он имеет степень окисления +3, что облегчает хелатирование иона, и в данном случае является наилучшим кандидатом для наших целей. В качестве хелатора выбран бифункциональный хелатор с макроциклическим ядром — DOTA (2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid). Подобные хелаторы способны образовывать высокостабильные металлокомплексы с ионами трехвалентных металлов (Lu^{3+} , Ga^{3+}), что обуславливает их применение в разработке радиофармацевтических препаратов [20, 21].

Таким образом, при создании нового радиофармпрепарата следует учитывать не только степень связывания его с рецепторами на поверхности опухолевых клеток, но и стабильность, которая проявляется в способности пептидной конструкции оставаться постоянной (химическая стабильность) и удерживать радиоизотоп (радиохимическая стабильность).

Цель исследования — изучить химическую и радиохимическую стабильность структуры на основе короткого пептида бомбезина и токсина кноттина — BBN/C1-C2, а также способность полученной структуры связываться с опухолевыми клетками.

Материалы и методы

Синтез и анализ пептидной конструкции BBN/C1-C2. Модификацию и синтез бомбезина проводили на пептидном синтезаторе ResPer SL (Intavis, Германия) с использованием Fmoc-защищенных аминокислот на смоле TentaGel (Intavis, Германия). Синтез начинали с депротекции аминокислот 20% 4-метилпиперидином (Acros Organics, Бельгия) в диметилформамиде («Кемикал Лайн», Россия). Затем аминокислоты активировали реагентом HBTU (hexafluorophosphate benzotriazole tetramethyl uronium) («Кемикал Лайн», Россия) в присутствии N-метил-2-пирролидона и N-метилморфолина (PanReac AppliChem, Испания). Связывание выполняли с использованием 5% уксусного ангидрида (Sigma Aldrich, США). Основным растворителем во время синтеза выступал диметилформамид. Снятие со смолы проводили смесью из 92,5% трифторуксусной кислоты (PanReac AppliChem, Испания), 5% триизопропилсилана (Acros Organics, Бельгия) и 2,5% деионизированной воды в течение 3 ч при комнатной температуре. Затем пептид осаждали центрифугированием с использованием ледяного трет-бутилметилового эфира («Кемикал Лайн», Россия). В качестве хелатирующего агента для радиоизотопа применяли хелатор DOTA, прикрепление которого происходило в процессе пептидного синтеза при добавлении в форме tris-DOTA (Intavis, Германия).

Для сравнения использовали PSMA-617 (Huayí Isotopes, Китай), нацеленный на PSMA, в связи с

отсутствием коммерческих препаратов, направленных на бомбезиновые рецепторы.

Анализ синтеза, а также контроль чистоты коммерческого PSMA-617 (Huayí Isotopes, Китай) выполняли с использованием хроматографической системы Shimadzu LC-20AD XR (Shimadzu, Япония), оснащенной спектрофотометрическим детектором SPD-20A, по принципу обращенно-фазовой хроматографии с помощью колонки Luna C18 (Dr. Maisch, Германия) и градиентного элюирования от 95 до 0% ацетонитрила («Криохром», Россия) и от 0 до 100% — деионизированной воды в течение 40 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на основе масс-спектрометрии MALDI-TOF на масс-спектрометре MALDI-TOF MS серии FLEX (Bruker Daltonics, Германия). Пептид очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии — системы хроматографии NGC Quest 10 (Bio-Rad, США) с использованием сорбента Bio-Gel P-4 на колонке Econo-Column 1×30 cm (Bio-Rad, США).

Мечение пептидной конструкции BBN/C1-C2 и PSMA-617 изотопом лютеция и анализ стабильности. В качестве радиолиганда использовали хлорид лютеция ^{177}Lu . BBN/C1-C2 и PSMA-617 метили при 80°C в течение 20 мин при мольном соотношении хлорида лютеция (100 МБк в 0,05 N соляной кислоте) и пептида 1:10 в ацетатном буфере с pH=4 в присутствии аскорбиновой кислоты. Активность образцов измеряли с помощью гамма-счетчика ISOMED 2010 (PTW, Германия). Мечение пептидов проводили на комплексе Gaia/Luna (Elysia-Raytest, Германия). Радиохимическую чистоту анализировали на хроматографе Shimadzu (Shimadzu, Япония) с детектором GABI (Elysia-Raytest, Германия) при градиенте ацетонитрил/вода: 0–5 мин — 2% ацетонитрила, 5–20 мин — 95% ацетонитрила, 20–25 мин — 2% ацетонитрила; вода была подкислена трифторуксусной кислотой (0,01%). Система работала под управлением программного обеспечения Clarity (Clarity Software, Великобритания). Очистку меченых пептидов от свободного лютеция выполняли с помощью одноразовых картриджей C18 (ABX, Германия), использовали комплекс GAIA по принципу гель-фильтрации. Радиохимическую стабильность оценивали при тех же параметрах через 24, 48, 96 и 168 ч в 0,9% хлориде натрия при температуре 37°C. Химическую стабильность фиксировали аналогично в 0,9% хлориде натрия, как описано выше. Хроматографическую чистоту вычисляли в процентах площади пика целевого вещества от суммарной площади пиков на хроматограмме, принятой за 100%.

Мечение пептидной конструкции BBN/C1-C2 и PSMA-617 флуоресцентным красителем. Для анализа связывания использовали флуоресцентный краситель 6-FAM в форме амина («Люмипроб», Россия). Пептиды метили по стандартному протоколу производителя: растворяли в 0,1 М растворе NaHCO_3 , после чего к раствору добавляли краситель 6-FAM и инкуби-

ровали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Очистку пептидов от избытка красителя осуществляли методом спиртовой преципитации. Для очистки одну часть раствора меченого пептида смешивали с девятью частями охлажденного при температуре -20°C 95% этанола. Далее пептиды инкубировали в течение 90 мин также при температуре -20°C . После инкубации охлажденный раствор центрифугировали 15 мин при 13 000 об./мин в центрифуге Allegra (Beckman Coulter, США). После центрифугирования снимали супернатант, содержащий меченый пептид, и высушивали с использованием вакуумного концентратора (Eppendorf, Германия).

Анализ связывания меченных 6-FAM пептидов с клеточными культурами. Связывание пептидов проводили с использованием клеточных культур HCT-116, LnCap, PC-3, CHO-K1. Культуры HCT-116 (колоректальная карцинома человека) и CHO-K1 (эпителиальная клеточная линия, полученная из яичника китайского хомяка) получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных. Культуры LnCap (PSMA-положительная аденокарцинома предстательной железы человека) и PC-3 (PSMA-отрицательная аденокарцинома предстательной железы человека, полученная из костных метастаз) были любезно предоставлены Национальным медицинским исследовательским центром онкологии им. Н.Н. Блохина. Культуры HCT-116 и PC-3 содержались на питательной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera, Франция) и гентамицина в конечной концентрации 40 мкг/мл. Культура LnCap содержалась в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera, Франция), пирувата натрия, витаминов для RPMI и пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). Культура CHO-K1 содержалась в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Biosera, Франция) и гентамицина в конечной концентрации 40 мкг/мл. Все культуры содержались в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37°C и 5% CO_2 , пассаж выполняли каждые 3–4 дня с использованием 0,25% трипсина («ПанЭко», Россия), эксперимент проводили в пределах трех первых пассажей.

За 24 ч до начала эксперимента культуры высевали в 24-луночные планшеты в концентрации 100 000/луночку (культура LnCap — 150 000/луночку) для достижения экспоненциальной стадии. После этого к культуре добавляли FAM-меченые пептиды BBN/C1-C2 и PSMA-617 в конечной концентрации 1 мкМ и инкубировали их в течение 3 ч. По окончании инкубации среду с несвязавшимися пептидами удаляли, лунки планшета промывали охлажденным фосфатным буфером и фиксировали сигнал флуоресценции с использованием оптической системы, включающей микроскоп Nikon Ti-S, камеру DS-Qi1MC, объектив S Plan Fluor ELWD 20×0.45, фильтр 465-495/515-555 нм (Nikon, Япония) и компьютер с пакетом NIS-elements 4.0.

Количественный анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения ImageJ. Для каждого пептида анализировали сигнал флуоресценции с более 300 клеток. Интенсивность флуоресценции вычисляли по формуле: общая флуоресценция клеток = интегральная плотность – (площадь выделенной клетки × среднюю флуоресценцию фоновых показателей), как описывали А. Khokhlova с соавт. [22]. Кратко это выглядит так: для получения флуоресцентного сигнала каждой конкретной выделенной клетки в программе ImageJ снимается параметр интегральной плотности, затем из этого параметра вычитается флуоресценция фона, равного по площади размеру клетки. В качестве контроля фиксировали сигнал флуоресценции без добавления пептидов. Данные представляли в виде относительных единиц флуоресценции.

Анализ экспрессии генов, кодирующих целевые рецепторы. Тотальную РНК выделяли из суспензии клеточных линий НСТ-116, LnCap, РС-3 и CHO-K1 с помощью набора «Проба-НК» («ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции по применению, кДНК синтезировали с использованием набора для обратной транскрипции MMLV RT kit («Евроген», Россия) с рандомными декануклеотидными праймерами. ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили на готовой смеси для ПЦР 5X qPCRmix-HS с Taq-полимеразой («Евроген», Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Выравнивание результатов для определения относительного уровня экспрессии генов *GRPR* и *FOLH-1* (PSMA) выполняли на мРНК гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Реакция по гену *GAPDH* также служила в качестве внутреннего контроля для определения эффективности выделения РНК и прохождения реакции обратной транскрипции. Для постановки ПЦР в режиме реального времени подбирали видоспецифические праймеры и зонды на мРНК генов *GRPR*, *FOLH-1* (PSMA), а также *GAPDH* человека и *GAPDH Cricetus griseus* (при анализе РНК, выделенной из клеточной линии CHO-K1). Праймеры подбирали с соответствии с экзон-экзонными переходами для получения специфичности по отношению к мРНК, отсутствие положительного результата на геномной ДНК проверяли путем постановки ПЦР без обратной транскрипции на образцах геномной ДНК человека, а также ДНК, выделенной из клеточной линии CHO-K1. Расчет уровня экспрессии проводили по формуле:

$$R=2^{[Ct(GAPDH)-Ct(GRPR/FOLH-1)]},$$

где R — относительный уровень экспрессии гена *GRPR/FOLH-1*; $Ct(GAPDH)$ — средний пороговый цикл (Ct) прохождения реакции *GAPDH*; $Ct(GRPR/FOLH-1)$ — средний пороговый цикл (Ct) прохождения реакции *GRPR/FOLH-1*.

Ни один человек/животное не принимали непосредственного участия в процессе отбора биоматериала

во время этого исследования. Российские нормативные акты не требуют согласования использования биоматериалов клеточных линий для научных исследований (Федеральный закон от 23 июня 2016 г. №180-ФЗ).

Статистическая обработка данных. При анализе связывания обработка данных была проведена в программе OriginPro (OriginLab Corporation, США; v. b9.5.0.193) с использованием критерия Стьюдента, при анализе стабильности — с помощью критерия Манна–Уитни. Для определения характера распределения использовали критерий асимметрии и эксцесса. Поскольку данные при анализе связывания сравнивались с контрольной группой, а также с отрицательной группой (культура CHO-K1), для устранения эффекта множественных сравнений применяли критерий Бонферрони и различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,02$. Все данные представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение, SD — стандартное отклонение.

Результаты

Синтез и анализ пептидов. В результате твердофазного синтеза получена пептидная конструкция BBN/C1-C2 с молекулярной массой 5266,935 Да и чистотой более 80% (рис. 1).

Поскольку молекулярная конструкция создана на основе кноттина, который формирует три дисульфидных мостика, необходимо было провести рефолдинг дисульфидных связей. В итоге молекулярная масса конструкции изменилась на 5260,163 Да. После последующей очистки чистота сложного пептида составляла 95,1%, чистота коммерческого PSMA-617 — 99,1%.

Мечение пептидной конструкции BBN/C1-C2 и PSMA-617 изотопом лютеция и анализ стабильности. При мечении BBN/C1-C2 и PSMA-617 изотопом лютеция ^{177}Lu получены следующие результаты (рис. 2). Видно, что выход мечения BBN/C1-C2 и PSMA-617 составляет 80–90%.

При анализе стабильности меченых структур выявлено, что открепление радиоизотопа от Lu-PSMA-617 происходит уже в первые 24 ч, радиохимическая чистота снижается с $(99,7 \pm 3,2)$ до $(39,6 \pm 4,1)$ % (рис. 3, а).

Через 48 ч после окончания мечения радиохимическая чистота Lu-PSMA-617 снижается до $(19,7 \pm 2,9)$ %, а через 168 ч она составляет $(9,2 \pm 0,7)$ %. Химическая стабильность PSMA-617 также снижается. Так, в первые 24 ч чистота падает с $(99,1 \pm 2,6)$ до $(80,6 \pm 6,7)$ %, а через 168 ч она составляет $(42,9 \pm 3,4)$ % (рис. 3, б). При этом BBN/C1-C2 на основе кноттина сохраняет не только радиохимическую стабильность, но и химическую. Так, химическая стабильность BBN/C1-C2 через 24 ч составляет $(93,4 \pm 6,2)$ % от изначальных $(95,1 \pm 5,7)$ %, через 48 ч — $(92,6 \pm 3,9)$ %, а через 168 ч — $(90,1 \pm 4,3)$ % (см. рис. 3, б). Радиохимическая

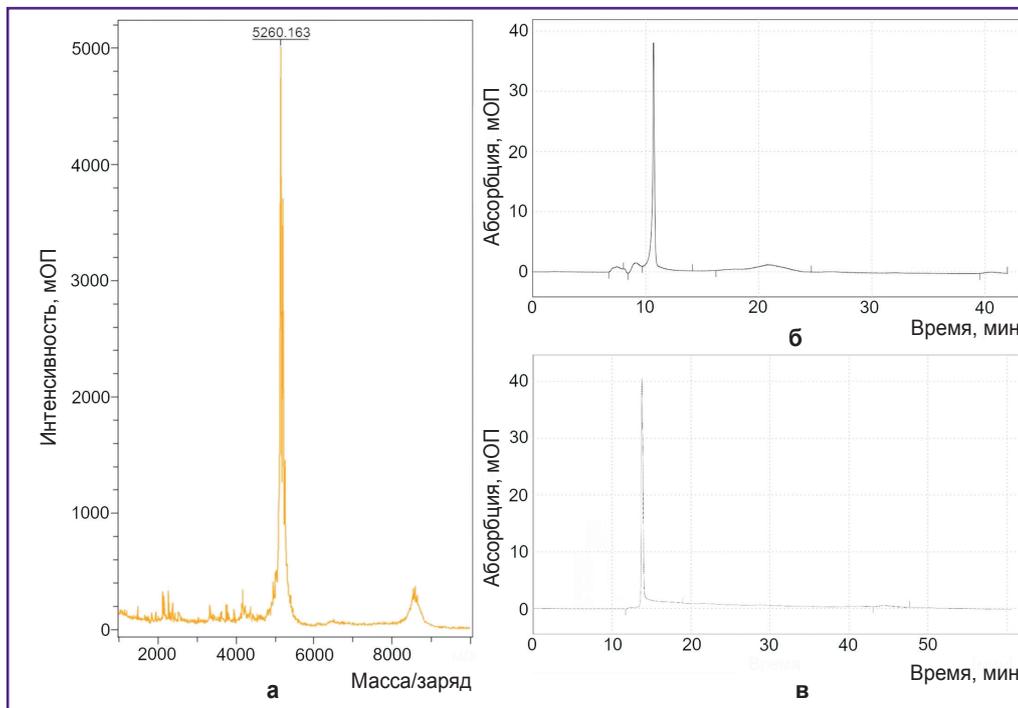


Рис. 1. Масс-спектрограмма (а), хроматограмма (б) пептидной конструкции BBN/C1-C2 и хроматограмма PSMA-617 (в)

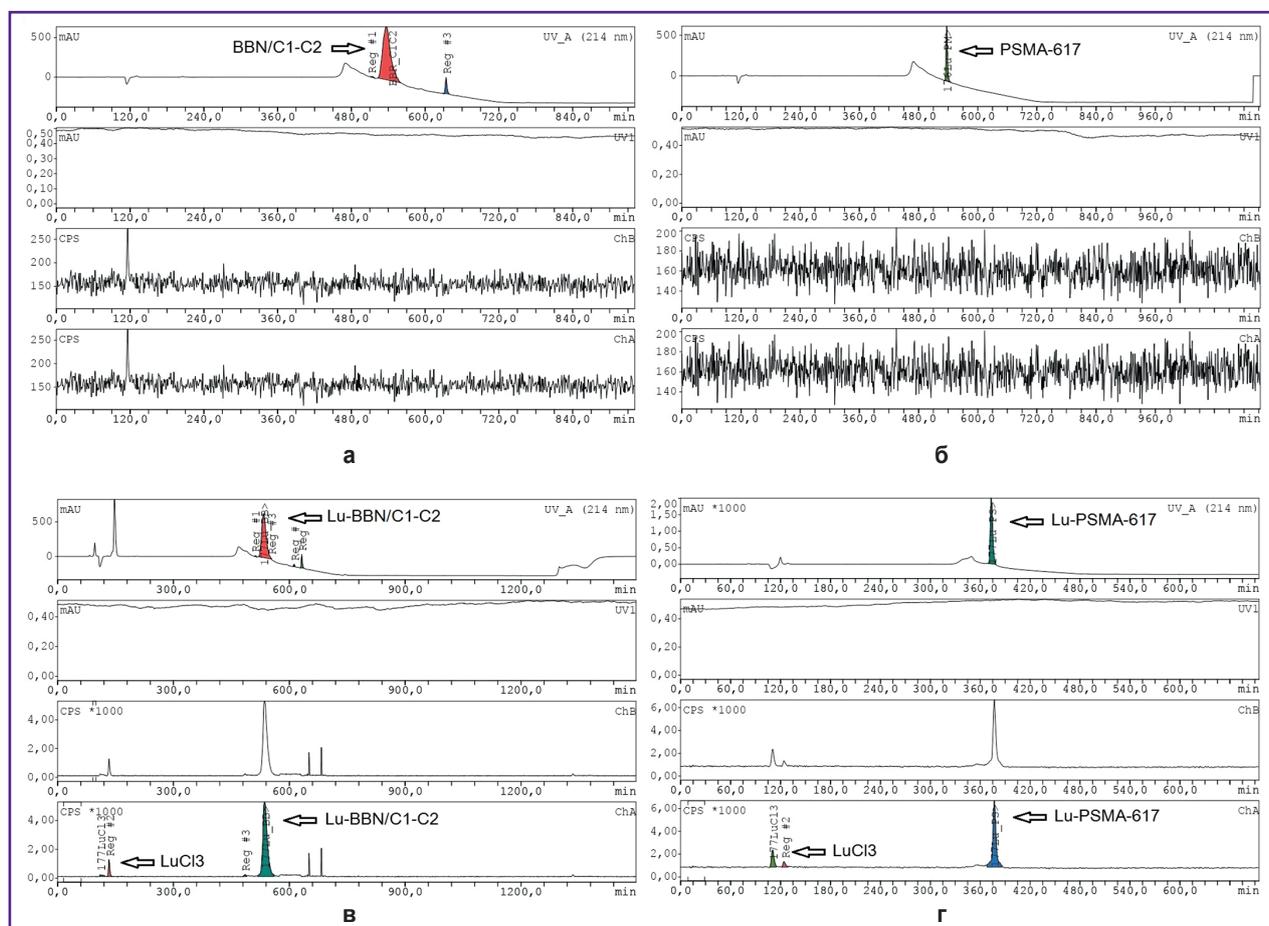


Рис. 2. Радиохроматограммы пептидной конструкции BBN/C1-C2 (а, в) и предшественника PSMA-617 (б, г) до мечения (а, б) и после мечения (в, г)

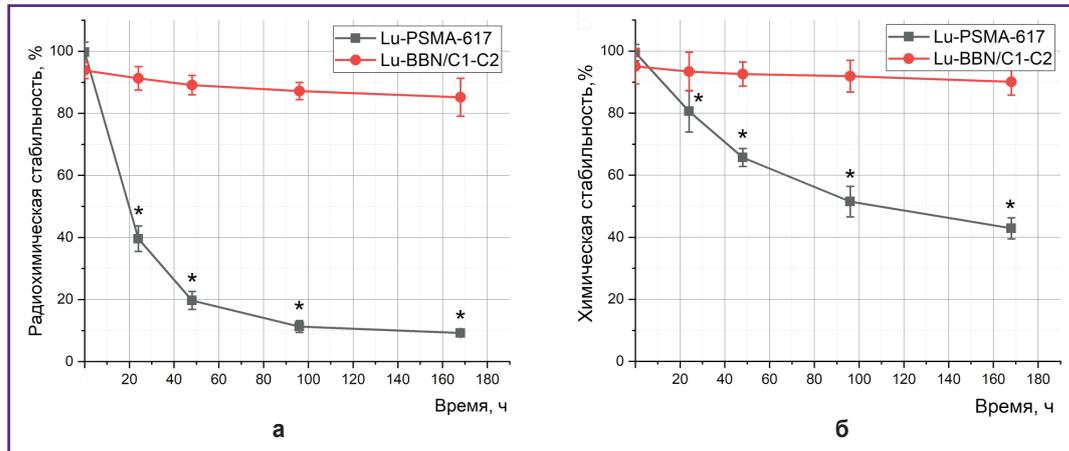


Рис. 3. Радиохимическая (а) и химическая (б) стабильность BBN/C1-C2 и PSMA-617

* статистически значимое различие с BBN/C1-C2

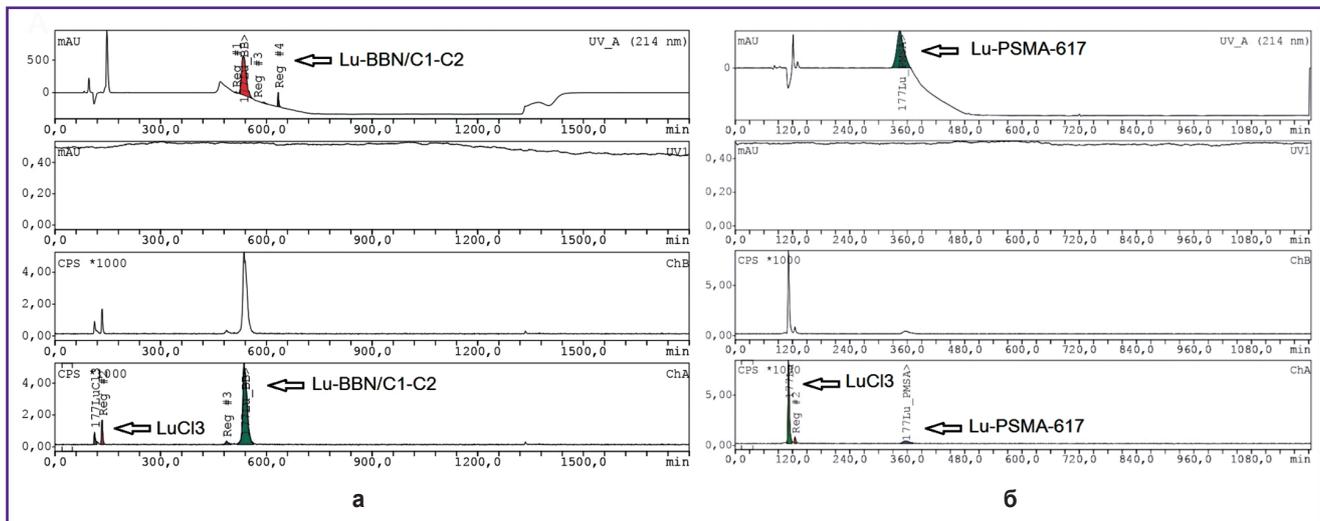


Рис. 4. Радиохроматограммы Lu-BBN/C1-C2 (а) и Lu-PSMA-617 (б)

чистота также снижается незначительно: через 24 ч после окончания мечения она составляет $(91,3 \pm 3,8)\%$ от $(93,8 \pm 2,6)\%$ изначальных, через 48 ч — $(89,1 \pm 3,1)\%$, а через 168 ч — $(85,2 \pm 6,2)\%$.

Радиохроматограммы меченых структур через 168 ч представлены на рис. 4, где можно увидеть, что через 168 ч радиоизотоп практически полностью открепился от молекулы PSMA-617, в то время как BBN/C1-C2 сохраняет результат мечения на уровне 80%.

Анализ связывания 6-FAM-меченых пептидов с клеточными культурами. Поскольку решающим фактором для таргетных структур является не только химическая и радиохимическая стабильность, но и их способность прикрепляться к рецепторам на поверхности раковых клеток, было проанализировано связывание флуоресцентно-меченых молекул BBN/C1-C2 и PSMA-617 с соответствующими рецепторами на поверхности клеток — бомбезиновым

рецептором для молекулы BBN/C1-C2 и простатспецифическим мембранным антигеном для молекулы PSMA-617 (рис. 5). Видно, что молекула PSMA-617 связывается с культурой LnCar, поскольку данные клетки в значительной степени экспрессируют PSMA (рис. 5, в). В то же время с культурами HCT-116, PC-3 и CHO-K1 данная молекула не связывается, что обусловлено отсутствием или низкой экспрессией целевых рецепторов. И наоборот, пептидная структура BBN/C1-C2 на основе тропного короткого бомбезинового пептида и кноттина в значительной степени связывается со всеми тремя опухолевыми культурами, в особенности с культурой LnCar, поскольку эти культуры значительно экспрессируют рецептор бомбезина, в то время как культура CHO-K1 экспрессирует данный рецептор в незначительном количестве, в связи с чем сигнал флуоресценции не фиксировался в пределах эксперимента.

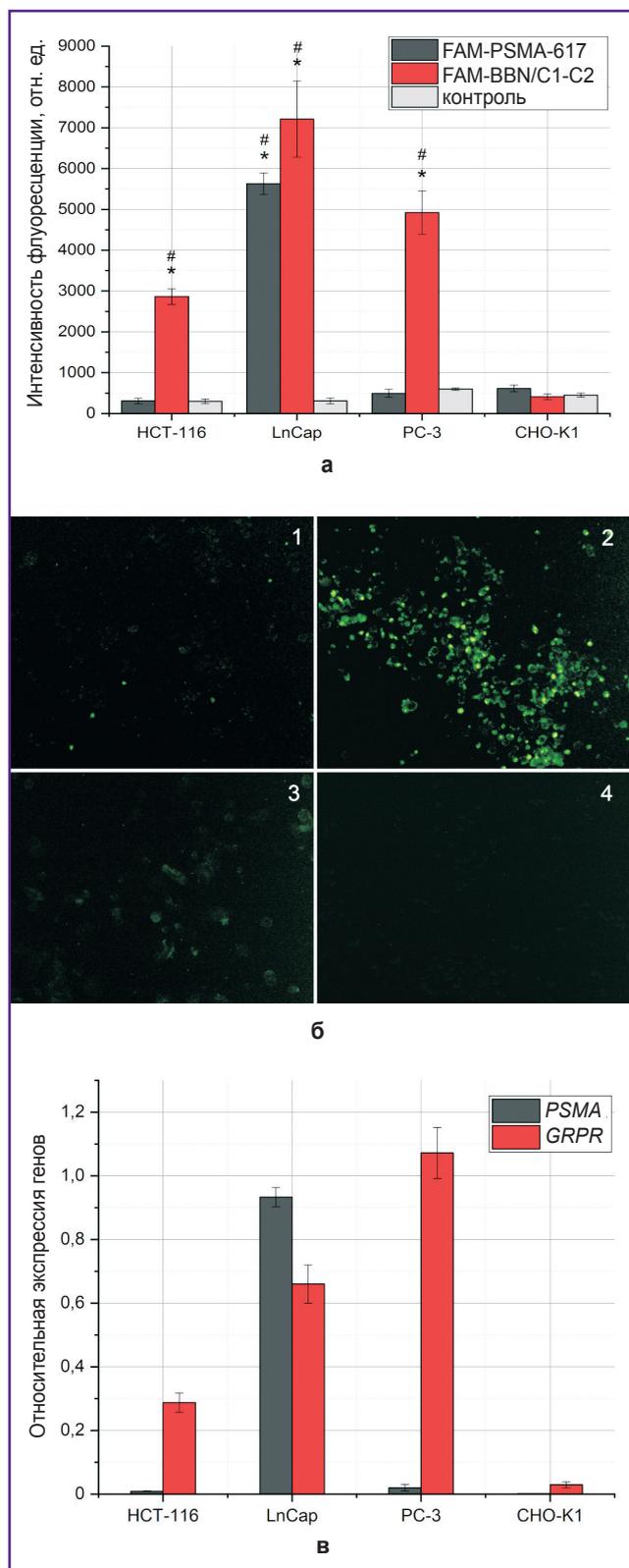


Рис. 5. Результаты связывания 6-FAM-BBN/C1-C2 и 6-FAM-PSMA-617 (а) с культурами HCT-116 (б, 1), LnCap (б, 2), PC-3 (б, 3) и CHO-K1 (б, 4) в соответствии с уровнем экспрессии гена, кодирующего целевой рецептор (е) (представлено фото для 6-FAM-BBN/C1-C2)

* статистически значимое различие с контролем, # статистически значимое различие с культурой CHO-K1

Обсуждение

Одним из ключевых аспектов терапии рака является адресная доставка терапевтических агентов к раковым клеткам, позволяющая максимизировать эффективность лечения и минимизировать вред для здоровых тканей. Биоактивные пептиды привлекли внимание благодаря своим потенциальным противораковым свойствам. Подходы на основе использования пептидов предлагают несколько преимуществ при лечении рака, включая повышенную специфичность, снижение токсичности для нормальных тканей и универсальность в воздействии на различные молекулярные пути, участвующие в прогрессировании рака [23]. Так, например, первое поколение радиолигандов бомбезина представляли агонисты GRPR, полученные из С-концевых фрагментов тетрадекапептида бомбезина амфибий. Агонисты GRPR обладают свойством интернализироваться при связывании с рецепторами, что способствует длительному удержанию препарата в клетке-мишени и считается предпосылкой для высокого поглощения *in vivo* [24]. Одним из первых радиолигандов бомбезинового рецептора стал препарат (99m)Tc-N(3)S-X-BBN[7-14]NH(2) [25]. Препарат был опробован на небольшой группе пациентов с раком простаты и молочной железы и помог успешно визуализировать четыре из шести случаев рака молочной железы и одну из четырех андроген-резистентных карцином предстательной железы, метастазирующих в кости [26]. Еще одно, более современное исследование [27] показало Ga-меченый антагонист GRPR в качестве перспективного агента для визуализации рака. Работа была проведена на модели ксенотранспланта опухоли клеток PC-3. Исследуемый антагонист GRPR показал высокое поглощение опухолью при крайне низком поглощении здоровыми тканями, что дает высокий контраст опухоли к фоновым тканям при проведении ПЭТ-исследования.

Основным ограничением для широкого применения пептидов в качестве лекарств является их низкая стабильность *in vivo* вследствие чувствительности к экстремальным условиям внутренней среды организма, таким как температура и действие ферментов [28]. Одним из ключевых протеолитических ферментов является нейтральная эндопептидаза, ответственная за каталитическую инактивацию многих нейропептидных субстратов, включая бомбезин-подобные пептиды. Нейтральная эндопептидаза в избытке экспрессируется в организме человека, включая стенки сосудов, основные органы и ткани, потенциально затрудняя визуализацию и терапию путем расщепления радиопептидов на аминокислотной стороне гидрофобных аминокислот. Высвобожденные неактивные радио-метаболиты не могут взаимодействовать с рецепторами-мишенями, ассоциированными с опухолью, и в результате диагностическая чувствительность и терапевтическая эффективность серьезно снижаются [29]. Другой проблемой терапевтического применения пеп-

тидов является их быстрый почечный клиренс, связанный с чувствительностью пептидов к фильтрации почечными клубочками вследствие небольшого размера и с затрудненной реадсорбцией через почечные канальцы [30]. Увеличение физического размера молекулы будет способствовать сопротивлению почечному клиренсу и увеличению времени циркуляции молекулы в крови.

Одним из способов преодоления ограничения со стороны протеаз и увеличения стабильности пептидов к условиям среды организма является использование пептидов с цистиновым узлом. Такие пептиды представляют собой класс пептидов длиной 30–50 аминокислот. Благодаря своей своеобразной трехмерной структуре они обладают высокой устойчивостью к повышению температуры и воздействию протеаз. В нашей работе использован короткий пептид бомбезин, стабилизированный за счет включения в структуру токсина U5-scytotoxin-Sth1a из паука *Scytodes thoracica*. Выполнен сравнительный анализ BBN/C1-C2 с PSMA-617 в связи с отсутствием коммерческих радиофармпрепаратов, направленных на бомбезиновые рецепторы.

В настоящее время активно ведутся подобные исследования с использованием кноттинов в качестве каркаса для терапевтических пептидов. Например, A.P. Silverman и соавт. [31] использовали укороченную форму агути-родственного белка (AgRP), пептида с цистиновым узлом в качестве молекулярного каркаса для пептидов, тропных $\alpha_3\beta_3$ -интегринам. Полученные синтетические пептиды показали более высокую специфичность к целевому рецептору, а также отсутствие неспецифического связывания, характерного для исходного терапевтического пептида. Однако такие сконструированные пептиды, как описанный выше, обладают меньшей стабильностью в отличие от пептидов на основе кноттинов, полученных из природных источников.

В 2021 г. Т. Kimura [32] опубликовал работу, в которой исследовал возможность использования кноттина GTx1-15, выделенного из яда паука птицеда *Grammostola rosea*, в качестве каркаса для терапевтических пептидов. Кноттин показал высокую стабильность в плазме крови, низкую цитотоксичность и антигенность. Данный кноттин рассматривается автором исключительно как перспективный каркас для будущих терапевтических молекул. Однако дальнейших исследований с практическим применением кноттина GTx1-15 не проводилось.

Структура BBN/C1-C2 в сравнении с PSMA-617 сохраняет в течение длительного времени не только химическую стабильность, но и радиохимическую (см. рис. 3 и 4). Так, например, через 168 ч BBN/C1-C2 имеет химическую чистоту (90,1±4,3)%, а радиохимическую — (85,2±6,1)%. При этом PSMA-617 через такое же время сохраняет химическую чистоту (42,9±3,4)%, а радиохимическую — (9,2±0,7)%.

Отдельно было рассмотрено, влияет ли встраива-

ние тропного пептида в структуру токсина на связывание с поверхностью клеточных культур (см. рис. 5, а). PSMA-617 показал высокую степень прикрепления к культуре LnCaP, что связано с высокой экспрессией на поверхности клеток простатспецифического мембранного антигена, на который направлен данный препарат (см. рис. 5, в). В случае с конструкцией BBN/C1-C2 пептид связывался как с культурой HCT-116, так и с культурами LnCaP и PC-3. Все культуры экспрессируют на своей поверхности бомбезиновые рецепторы [33–35]. Однако в пределах эксперимента не зафиксирован сигнал флуоресценции при анализе связывания обоих пептидов с культурой CHO-K1, что вызвано либо отсутствием экспрессии рецептора PSMA, либо слабой экспрессией рецептора GRPR. В данном случае CHO-K1 использовали в качестве контрольной культуры для подтверждения отсутствия конкурентного связывания структуры BBN/C1-C2 с другими клеточными рецепторами и ионными каналами. Молекула BBN/C1-C2 создана на основе токсина, способного крепиться к ионным каналам млекопитающих, в связи с этим существовала вероятность, что исследуемая молекула независимо от наличия встраиваемого короткого пептида сохранит возможность связываться с ионными каналами на поверхности нормальных клеток [36]. Однако наше исследование показало, что молекула BBN/C1-C2 связывается исключительно с целевыми рецепторами бомбезина, что, по всей вероятности, обусловлено модификацией ключевого домена токсина, отвечающего за связывание с каналом-мишенью.

Заключение

Созданная на основе короткого пептида бомбезина и токсина с цистиновым ингибиторным узлом (кноттина) конструкция обладает повышенной стабильностью, при этом сохраняет способность связываться с раковыми клетками. Это позволяет рассматривать стратегию создания подобных структур на основе кноттинов в качестве стабилизирующего каркаса для коротких пептидов при дальнейшей разработке пептид-рецепторной терапии.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект №123020700216 (FEUF-2023-0004)).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Lu X., Lu C., Yang Y., Shi X., Wang H., Yang N., Yang K., Zhang X. Current status and trends in peptide receptor radionuclide therapy in the past 20 years (2000–2019): a bibliometric study. *Front Pharmacol* 2021; 12: 624534, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.624534>.

2. Sriram K., Insel P.A. G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol Pharmacol* 2018; 93(4): 251–258, <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>.
3. Jensen R.T., Battey J.F., Spindel E.R., Benya R.V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 2008; 60(1): 1–42, <https://doi.org/10.1124/pr.107.07108>.
4. Moody T.W., Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides* 2004; 25(3): 511–520, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.02.012>.
5. Ramos-Álvarez I., Moreno P., Mantey S.A., Nakamura T., Nuche-Berenguer B., Moody T.W., Coy D.H., Jensen R.T. Insights into bombesin receptors and ligands: highlighting recent advances. *Peptides* 2015; 72: 128–144, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.026>.
6. Hoppenz P., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. Peptide-drug conjugates and their targets in advanced cancer therapies. *Front Chem* 2020; 8: 571, <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00571>.
7. Liolios C., Buchmuller B., Bauder-Wüst U., Schäfer M., Leotta K., Haberkorn U., Eder M., Kopka K. Monomeric and dimeric ⁶⁸Ga-labeled bombesin analogues for positron emission tomography (PET) imaging of tumors expressing gastrin-releasing peptide receptors (GRPRs). *J Med Chem* 2018; 61(5): 2062–2074, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01856>.
8. Engel J.B., Keller G., Schally A.V., Halmos G., Hammann B., Nagy A. Effective inhibition of experimental human ovarian cancers with a targeted cytotoxic bombesin analogue AN-215. *Clin Cancer Res* 2005; 11(6): 2408–2415, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-1670>.
9. Reubi J.C., Fleischmann A., Waser B., Rehm R. Concomitant vascular GRP-receptor and VEGF-receptor expression in human tumors: molecular basis for dual targeting of tumoral vasculature. *Peptides* 2011; 32(7): 1457–1462, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.007>.
10. Fleischmann A., Waser B., Reubi J.C. High expression of gastrin-releasing peptide receptors in the vascular bed of urinary tract cancers: promising candidates for vascular targeting applications. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(2): 623–633, <https://doi.org/10.1677/erc-08-0316>.
11. Moody T.W., Moreno P., Jensen R.T. Neuropeptides as lung cancer growth factors. *Peptides* 2015; 72: 106–111, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.018>.
12. Schulz S., Röcken C., Schulz S. Immunohistochemical detection of bombesin receptor subtypes GRP-R and BRS-3 in human tumors using novel antipeptide antibodies. *Virchows Arch* 2006; 449(4): 421–427, <https://doi.org/10.1007/s00428-006-0265-7>.
13. Li M., Liang P., Liu D., Yuan F., Chen G.C., Zhang L., Liu Y., Liu H. Bombesin receptor subtype-3 in human diseases. *Arch Med Res* 2019; 50(7): 463–467, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.11.004>.
14. Erspamer V., Falconieri Erspamer G., Inselivini M., Negri L. Occurrence of bombesin and alytesin in extracts of the skin of three European discoglossid frogs and pharmacological actions of bombesin on extravascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1972; 45(2): 333–348, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1972.tb08087.x>.
15. Minamino N., Kangawa K., Matsuo H. Neuromedin C: a bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 119(1): 14–20, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(84\)91611-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)91611-5).
16. McDonald T.J., Jörnvall H., Nilsson G., Vagne M., Ghatei M., Bloom S.R., Mutt V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90(1): 227–233, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(79\)91614-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(79)91614-0).
17. Xiao C., Reitman M.L. Bombesin-like receptor 3: physiology of a functional orphan. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27(9): 603–605, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.03.003>.
18. Iurova E., Beloblov I., Beloborodov E., Rastorgueva E., Pogodina E., Tazintseva E., Fomin A. PSMA-specific peptide with inhibitor cystine knot for prostate cancer treatment. *Sys Rev Pharm* 2020; 11(9): 187–194.
19. George S.C., Samuel E.J.J. Developments in ¹⁷⁷Lu-based radiopharmaceutical therapy and dosimetry. *Front Chem* 2023; 11: 1218670, <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1218670>.
20. Tornesello A.L., Buonaguro L., Tornesello M.L., Buonaguro F.M. New insights in the design of bioactive peptides and chelating agents for imaging and therapy in oncology. *Molecules* 2017; 22(8): 1282, <https://doi.org/10.3390/molecules22081282>.
21. Baranyai Z., Tircsó G., Rösch F. The use of the macrocyclic chelator DOTA in radiochemical separations. *Eur J Inorg Chem* 2019; 2020(1): 36–56, <https://doi.org/10.1002/ejic.201900706>.
22. Khokhlova A., Zolotovskii I., Pogodina E., Saenko Y., Stoliarov D., Vorsina S., Fotiadi A., Liamina D., Sokolovski S., Rafailov E. Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. In: *Proceedings of the SPIE — International Society for Optical Engineering*. Vol. 10861. San Francisco; 2019.
23. Nhàn N.T.T., Yamada T., Yamada K.H. Peptide-based agents for cancer treatment: current applications and future directions. *Int J Mol Sci* 2023; 24(16): 12931, <https://doi.org/10.3390/ijms241612931>.
24. Baratto L., Jadvar H., Iagaru A. Prostate cancer theranostics targeting gastrin-releasing peptide receptors. *Mol Imaging Biol* 2018; 20(4): 501–509, <https://doi.org/10.1007/s11307-017-1151-1>.
25. Smith C.J., Gali H., Sieckman G.L., Higginbotham C., Volkert W.A., Hoffman T.J. Radiochemical investigations of ^{99m}Tc-N₃S-X-BBN[7-14]NH₂: an in vitro/in vivo structure-activity relationship study where X = 0-, 3-, 5-, 8-, and 11-carbon tethering moieties. *Bioconjug Chem* 2003; 14(1): 93–102, <https://doi.org/10.1021/bc020034r>.
26. Van de Wiele C., Dumont F., Vanden Broecke R., Oosterlinck W., Cocquyt V., Serreyn R., Peers S., Thornback J., Slegers G., Dierckx R.A. Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *Eur J Nucl Med* 2007; 27: 1694–1699, <https://doi.org/10.1007/s002590000355>.
27. Wang L., Zhang Z., Merckens H., Zeisler J., Zhang C., Roxin A., Tan R., Bénard F., Lin K.S. ⁶⁸Ga-labeled [Leu¹³ψThz¹⁴] bombesin(7–14) derivatives: promising GRPR-targeting PET tracers with low pancreas uptake. *Molecules* 2022; 27(12): 3777, <https://doi.org/10.3390/molecules27123777>.
28. Pernot M., Vanderesse R., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M. Stability of peptides and therapeutic success

in cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011; 7(7): 793–802, <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.574126>.

29. Shipp M.A., Tarr G.E., Chen C.Y., Switzer S.N., Hersh L.B., Stein H., Sunday M.E., Renherz E.L. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(23): 10662–10666, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10662>.

30. Di L. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *AAPS J* 2015; 17(1): 134–143, <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3>.

31. Silverman A.P., Levin A.M., Lahti J.L., Cochran J.R. Engineered cystine-knot peptides that bind alpha(v)beta(3) integrin with antibody-like affinities. *J Mol Biol* 2009; 385(4): 1064–1075, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.004>.

32. Kimura T. Stability and safety of inhibitor cystine knot peptide, GTx1-15, from the tarantula spider *Grammostola rosea*. *Toxins (Basel)* 2021; 13(9): 621, <https://doi.org/10.3390/toxins13090621>.

33. Accardo A., Galli F., Mansi R., Del Pozzo L., Aurilio M.,

Morisco A., Ringhieri P., Signore A., Morelli G., Aloj L. Pre-clinical evaluation of eight DOTA coupled gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) ligands for in vivo targeting of receptor-expressing tumors. *EJNMMI Res* 2016; 6(1): 17, <https://doi.org/10.1186/s13550-016-0175-x>.

34. Körner M., Waser B., Rehmann R., Reubi J.C. Early over-expression of GRP receptors in prostatic carcinogenesis. *Prostate* 2014; 74(2): 217–224, <https://doi.org/10.1002/pros.22743>.

35. Rick F.G., Buchholz S., Schally A.V., Szalontay L., Krishan A., Datz C., Stanlmar A., Aigner E., Perez R., Seitz S., Block N.L., Hohla F. Combination of gastrin-releasing peptide antagonist with cytotoxic agents produces synergistic inhibition of growth of human experimental colon cancers. *Cell Cycle* 2012; 11(13): 2518–2525, <https://doi.org/10.4161/cc.20900>.

36. Kalia J., Milescu M., Salvatierra J., Wagner J., Klint J.K., King G.F., Olivera B.M., Bosmans F. From foe to friend: using animal toxins to investigate ion channel function. *J Mol Biol* 2015; 427(1): 158–175, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.027>.