

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА РАДИОФАРМПРЕПАРАТА BBN/C1-C2, НАЦЕЛЕННОГО НА БОМБЕЗИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, В МОДЕЛИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

DOI: 10.17691/stm2025.17.6.03

УДК 616.65–006:615.2:577.112.6

Поступила 28.10.2024 г.



Е.А. Белобородов, научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин НИТИ им. С.П. Капицы;
Е.В. Юрова, младший научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин НИТИ им. С.П. Капицы;
Д.Р. Долгова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии НИТИ им. С.П. Капицы; директор Научно-исследовательского медико-биологического центра; доцент кафедры физиологии и патофизиологии;
А.А. Ермакова, стажер-исследователь лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин НИТИ им. С.П. Капицы;
Д.Е. Сугак, младший научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин НИТИ им. С.П. Капицы;
А.Н. Фомин, к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин НИТИ им. С.П. Капицы;
Ю.В. Саенко, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин НИТИ им. С.П. Капицы

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

Рецептор пептида, высвобождающего гастрин (GRPR), представляет собой рецептор, сопряженный с G-белком, который экспрессируется в центральной нервной системе, желудочно-кишечном тракте, поджелудочной железе и тканях коры надпочечников, регулируя их физиологические функции. Помимо нормальных тканей, GRPR сверхэкспрессируется во многих солидных раковых опухолях. На сегодняшний день несколько радиоактивно-меченых лигандов, нацеленных на GRPR, были введены в клинику для диагностики рака и радиолигандной терапии. Однако были выявлены высокие дозы накопления радиофармпрепаратов в нормальных органах, а также их низкая биодоступность, обусловленная стабильностью. В связи с этим для повышения терапевтической эффективности в настоящее время ведется поиск радиоантагонистов GRPR с улучшенной протеолитической стабильностью и более длительным временем удержания в опухолевых очагах с низким поглощением в нецелевых органах.

Цель исследования — изучение биораспределения молекулы BBN/C1-C2, созданной на основе бомбезина и кноттина, и динамики ее накопления в опухоли в модели *in vivo*.

Материалы и методы. Анализировали биораспределение Су7.5-меченного BBN/C1-C2, созданного на основе бомбезина и кноттина U5-Sth1a, и полученного с использованием твердофазного пептидного синтеза. Исследование проводили на мышинной модели Nu/Nu с перевитой в правый бок опухолью рака предстательной железы (культура PC-3) солидного типа, экспрессирующей GRPR, с использованием поверхностного флуоресцентного имиджинга в режиме реального времени на 2-е и 5-е сутки после внутривенного введения исследуемых молекул.

Результаты. Анализ биораспределения показал избирательное связывание молекулы BBN/C1-C2 с опухолью, а также ее способность удерживаться на поверхности опухоли до 5 дней без интернализации внутрь клеток при низком накоплении в нормальных органах и тканях.

Закключение. Нам удалось получить стабильную молекулу, однако в качестве каркаса использовался токсин U5-Sth1a, тропный к ионным каналам, в результате чего у полученной молекулы сохранился домен, отвечающий за прикрепление к каналу-мишени и характерный для кноттина. Это может в будущем, при использовании молекулы в качестве лиганда для радиотерапии, негативно сказаться на сердце пациента из-за дополнительной радиационной нагрузки. В связи с этим молекула BBN/C1-C2 требует дополнительного исследования.

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

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

Как цитировать: Beloborodov E.A., Iurova E.V., Dolgova D.R., Ermakova A.A., Sugak D.E., Fomin A.N., Saenko Y.V. Biodistribution of the bombesin receptor-targeted radiopharmaceutical precursor BBN/C1-C2 in a prostate cancer model. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2025; 17(6): 25, <https://doi.org/10.17691/stm2025.17.6.03>

English

Biodistribution of the Bombesin Receptor-Targeted Radiopharmaceutical Precursor BBN/C1-C2 in a Prostate Cancer Model

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

E.V. Iurova, Junior Researcher, Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

D.R. Dolgova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, S.P. Kapitsa National Research Institute of Technology; Director of the Research Medical and Biological Center; Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology;

A.A. Ermakova, Research Assistant, Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

D.E. Sugak, Junior Researcher, Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute;

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

Y.V. Saenko, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Research and Development of Peptide Drugs and Vaccines, S.P. Kapitsa Technological Research Institute

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

Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) is a G protein-coupled receptor expressed in the central nervous system, the gastrointestinal tract, the pancreas, and the adrenal cortical tissue regulating their physiological functions. In addition to normal tissues, GRPR is overexpressed in many solid cancers. At present, several radiolabeled ligands targeting GRPR have been introduced into clinical practice for cancer diagnostics and radioligand therapy. However, there were found the high uptake of radiopharmaceuticals in normal organs and low bioavailability of the drugs caused by their stability. Therefore, GRPR radioantagonists with improved proteolytic stability and longer residence time in tumor foci with low uptake in non-target organs are currently being sought to improve the therapeutic efficacy.

The aim of the study was to analyze the biodistribution of the BBN/C1-C2 molecule created on the basis of bombesin and knottin and its accumulation dynamics in the tumor in an *in vivo* model.

Materials and Methods. The study analyzed the biodistribution of Cy7.5-labeled BBN/C1-C2 peptide based on bombesin and knottin U5-Sth1a and produced using solid-phase peptide synthesis. The investigation was carried out on a mouse model Nu/Nu with a prostate cancer solid tumor (PC-3 culture) transplanted into the right side, expressing GRPR, using real-time surface fluorescent imaging on days 2 and 5 after intravenous administration of the molecules under study.

Results. The biodistribution analysis showed the selective binding of the BBN/C1-C2 molecule to a tumor, as well as its holding power on the tumor surface for up to 5 days without internalization into cells with low accumulation in normal organs and tissues.

Conclusion. We managed to obtain a stable molecule; however, U5-Sth1a toxin tropic to ion channels was used as a scaffold, so the resulting molecule retained the domain responsible for attaching to the target channel and typical for knottin. In the future, when using the molecule as a ligand for radiotherapy, it can have a negative effect on the patient's heart due to the supplementary radiation load. In this regard, the BBN/C1-C2 molecule requires the extension study.

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

Введение

Рецептор пептида, высвобождающего гастрин (GRPR), представляет собой рецептор, сопряженный с G-белком, который экспрессируется в центральной нервной системе, желудочно-кишечном тракте, поджелудочной железе и тканях коры надпочечников, регулируя их физиологические функции [1]. Помимо

нормальных тканей GRPR сверхэкспрессируется во многих солидных раковых опухолях. Например, GRPR ассоциирован с ростом карциномы предстательной железы [2], аденокарциномы молочной железы [3] и колоректального рака [4]. В связи с этим разработка радиофармпрепаратов, нацеленных на GRPR, является перспективной целью для визуализации и терапии новообразований.

На сегодняшний день для диагностики рака и радиолигандной терапии в клинику были введены несколько радиоактивно-меченых лигандов, нацеленных на GRPR, которые основаны на аналоге гастрин-высвобождающего пептида (GRP), выделенного из амфибии, — бомбезине (BBN) [5–8]. Однако у пациентов и в доклинических животных моделях были обнаружены высокие дозы накопления радиофармпрепаратов в нормальных органах, особенно в поджелудочной железе [7, 8]. Помимо высокого накопления радиофармпрепаратов в нецелевых органах существует еще одна значительная проблема, усложняющая лечение новообразований, — стабильность фармпрепарата. Молекула бомбезина показывает хорошее накопление в опухоли, однако обладает низкой протеолитической стабильностью [9]. При попытке стабилизировать бомбезин, например используя мотив [DPhe6,Leu13-NHET] (деомбизин), улучшаются свойства молекулы с GRPR и накопление препарата опухолью, однако сохраняется низкая протеолитическая стабильность [10]. Еще одна модификация бомбезина N4-AMA-DIG-[DPhe6,Sar11,LeuNHET13]BBN продемонстрировала повышенную устойчивость к протеолиту [11]. Это обусловило проводимые в настоящий момент активные исследования на пациентах. В связи с этим для повышения терапевтической эффективности актуален поиск радиоантагонистов GRPR с улучшенной протеолитической стабильностью и более длительным временем удержания в опухолевых очагах с низким поглощением в нецелевых органах.

В нашем предыдущем исследовании мы использовали кноттин из яда паука в качестве стабилизирующей молекулы, поместив короткий пептид бомбезин в домен между первым и вторым остатком цистеина (BBN/C1-C2) [12]. Доказав химическую и радиохимическую стабильность полученной молекулы, мы проанализировали способность молекулы BBN/C1-C2 связываться с поверхностью раковых клеток. В данном исследовании мы применяли метод *in vivo* визуализации, чтобы показать биораспределение созданной молекулы и динамику ее накопления в опухоли. Для сравнения использовался пептид GRP и нативный токсин, на основе которого создан BBN/C1-C2.

Материалы и методы

Синтез пептидов и контроль качества. Пептиды были синтезированы на автоматическом пептидном синтезаторе ResPer SL (Intavis, Германия). Синтез проводили на твердой подложке (TentaGel; Intavis, Германия) на основе Fmoc-химии. В качестве активатора использовали HBTU («Кемикал Лайн», Россия), растворенный в диметилфосфамиде (ДМФА) («Кемикал Лайн», Россия). Депротекцию выполняли пиперидином (PanReac Applichem, Испания) в ДМФА, кэпирование — с помощью 5% уксусного ангидрида (Acros Organics,

Бельгия). После синтеза пептиды снимали с подложки раствором, содержащим 95% трифторуксусной кислоты (Acros Organics, Бельгия), 5% триизопропилсилана (PanReac Applichem, Испания) и 5% деионизированной воды.

После синтеза химическую чистоту пептидов анализировали методом обращенно-фазовой хроматографии. Аппаратно-технический комплекс представлен системой высокоэффективной жидкостной хроматографии LC-20AD XR (Shimadzu, Япония), оснащенной спектрофотометрическим детектором и колонкой Luna C18(2) (Dr. Maisch, Германия). Элюирование — градиентное, подвижная фаза состояла из деионизированной воды и ацетонитрила. Содержание ацетонитрила в подвижной фазе увеличивали с 5% в начале до 100% в конце исследования в течение 40 мин. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Детектирование осуществляли на длине волны 215 нм, а также с использованием масс-спектрометрии на масс-спектрометре MALDI-TOF MS FLEX (Bruker Daltonics, Германия).

Очистку пептидов выполняли на хроматографе AutoPure25 (Inscinstech, Китай) методом обращенно-фазовой хроматографии с использованием колонки Galaksil EF-C18H (GALAK Chromatography Technology Co., Ltd, Китай). Элюирование — градиентное, подвижная фаза состояла из деионизированной воды и ацетонитрила. Содержание ацетонитрила в подвижной фазе увеличивали с 5% в начале до 100% в конце исследования в течение 90 мин. Скорость потока составляла 3 мл/мин. Детектирование осуществляли на длине волны 215 нм.

После очистки токсин и BBN/C1-C2 подвергали фолдингу в растворе, содержащем 10 мМ восстановленного и 1 мМ окисленного глутатиона в 0,1 М Трис-HCl («ПанЭко», Россия) при pH=8,0. Пептиды инкубировали в растворе при 4°C в течение 24 ч при постоянном перемешивании.

Мечение пептидов флуоресцентным красителем. Для визуализации биораспределения пептидов *in vivo* использовали краситель Суанип7.5 (далее Су7.5) (ООО «Люмипроб РУС», Россия), который обеспечивает свечение в области ближнего инфракрасного спектра (Ex/Em — 788/808 нм), благодаря чему краситель подсвечивается в зоне, где не светят природные молекулы. Мечение проводили активированным эфиром Су7.5 для связывания красителя с аминогруппой пептида по стандартному протоколу производителя. С этой целью пептиды растворяли в деионизированной воде в концентрации 1 мг/мл, затем раствор смешивали с 1 М бикарбоната натрия для достижения pH=8,3 всей реакционной смеси. Далее к раствору добавляли краситель, растворенный в ДМСО, в 8-кратном молярном избытке по отношению к пептиду. Смесь инкубировали 3 ч при комнатной температуре и при периодическом перемешивании. Через 3 ч смесь заливали 10-кратным избытком ледяного этилового спирта и центрифугировали при

21 000 g, 4°C в течение 30 мин. После этого очистку от несвязавшегося красителя повторяли.

Анализ стабильности пептидных комплексов. Изучали стабильность как целых структур (Cy7.5-BBN/C1-C2, Cy7.5-GRP, Cy7.5-U5-Sth1a), так и комплексов пептидов с красителем Cy7.5. Для этого все пептиды инкубировали в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) в течение 144 ч при 37°C. Пробы отбирали каждые 24 ч и анализировали с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии LC-20AD XR (Shimadzu, Япония), как описано выше. Фиксацию стабильности комплекса с красителем проводили аналогично фиксации стабильности пептида, исходя из накопления свободного красителя в пробах.

Флуоресцентная визуализация опухоли in vivo. Исследование проводили на самцах мышей линии Nu/Nu в возрасте 9–10 нед массой тела 26–28 г.

Работа с животными была одобрена комитетом Института медицины, экологии и физической культуры Ульяновского государственного университета. Комиссия по биоэтике до начала эксперимента оценивала дизайн исследования и согласовывала протокол на соответствие международным правовым и этическим нормам работы с лабораторными животными. Манипуляции выполняли в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006).

Поскольку стабильность пептида Cy7.5-GRP была ограничена в первую очередь 48 ч при 37°C в фосфатно-солевом буфере, для исследования использовали две временные точки — 2 и 5 сут. Животным за 2 нед подкожно в правый бок инокулировали клетки PC-3 (1 млн клеток в 100 мкл RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) и 100 мкл матригеля (ABW, Китай)) для формирования опухоли. Когда опухоль достигала оптимальных размеров (150–200 мм³), животных (n=10) распределяли на группы: 1-я группа — введение чистого красителя (n=1); 2-я группа — введение пептида Cy7.5-GRP (n=3); 3-я группа — введение токсина Cy7.5-U5-Sth1a (n=3); 4-я группа — введение Cy7.5-BBN/C1-C2 (n=3). Животных анестезировали ингаляцией 3% изофлурана (Chemical Iberica, Испания) со скоростью 1 л/мин в течение 10 мин, затем дозу снижали до 2%. Пептиды вводили в хвостовую вену из расчета 19 нмоль/кг. Съемку проводили в вентродорсальной проекции при дорсальной укладке с помощью системы VISQUE InVivo Smart-LF (Vieworks, Корея) с использованием светодиодов (LED) на фильтре (Ex/Em — 740–790/810–860 нм), выдержка — 1000 мс, биннинг — 2×2. Полученные результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения CleVue (Vieworks, Корея). На 5-е сутки животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации, у них изымали основные органы (печень, желудок, легкие, сердце, поджелудочная же-

леза, селезенка, тонкий кишечник и почки) для оценки биораспределения и также опухоль. Анализ сигнала флуоресценции с органов проводили в программе CleVue (Vieworks, Корея). Области интереса определяли вручную по границе органа, после чего с помощью программного обеспечения рассчитали общую флуоресценцию для каждой области. В итоге была получена средняя флуоресценция пептидов по органу, которая нормировалась на массу органа [13, 14].

Статистическая обработка данных. Обработку результатов проводили в OriginPro (v. b9.5.0.193; OriginLab Corporation, США;), где высчитывали статистическое различие с помощью критерия Манна–Уитни. Для определения характера распределения использовали критерий асимметрии и эксцесса. Для устранения эффекта множественных сравнений был применен критерий Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

Получены 3 пептида с чистотой более 90%: GRP — короткий пептид, тропный к рецепторам GRPR; токсин U5-Sth1a, который использовали в качестве каркаса для стабилизации бомбезина; и BBN/C1-C2, созданный на основе бомбезина и кноттина U5-Sth1a (рис. 1).

После синтеза пептиды были успешно помечены флуоресцентным зондом Cy7.5. Проанализирована стабильность как целых молекул, так и комплексов [Cy7.5]-пептид (рис. 2). Отмечено, что стабильность пептида Cy7.5-GRP значительно снижается в первые 48 ч (с 95,7 до 64,5%) и продолжает уменьшаться на протяжении следующих 144 ч, достигая 46,8%. Пептиды Cy7.5-BBN/C1-C2 и Cy7.5-U5Sth1a более стабильны в фосфатно-солевом буфере при нагревании. Химическая чистота Cy7.5-BBN/C1-C2 снижается с 96,4 до 87,4% за 144 ч, а Cy7.5-U5Sth1a — с 95,7 до 82,4%. Анализ стабильности комплексов пептидов с красителем показал, что в процессе инкубации в фосфатно-солевом буфере за 144 ч теряется около 5% красителя во всех группах.

При визуализации распределения трех молекулярных структур по органам (рис. 3), видно, что на 2-е сутки основной областью связывания GRP являлась селезенка, а органом выведения из организма — почка. Это обусловлено значительно меньшим размером короткого пептида относительно U5-Sth1a и BBN/C1-C2. В первые 2 сут наблюдалось накопление BBN/C1-C2 в области печени и селезенки, а также мочевого пузыря и подчелюстных слюнных желез (повышенный сигнал в проекции мочевого пузыря всех трех молекул может быть связан с незначительными остатками свободного красителя). На 5-е сутки повышенный сигнал для GRP детектировался в проекции органов ЖКТ и поджелудочной железы (в проекции тонкого кишечника был зафиксирован

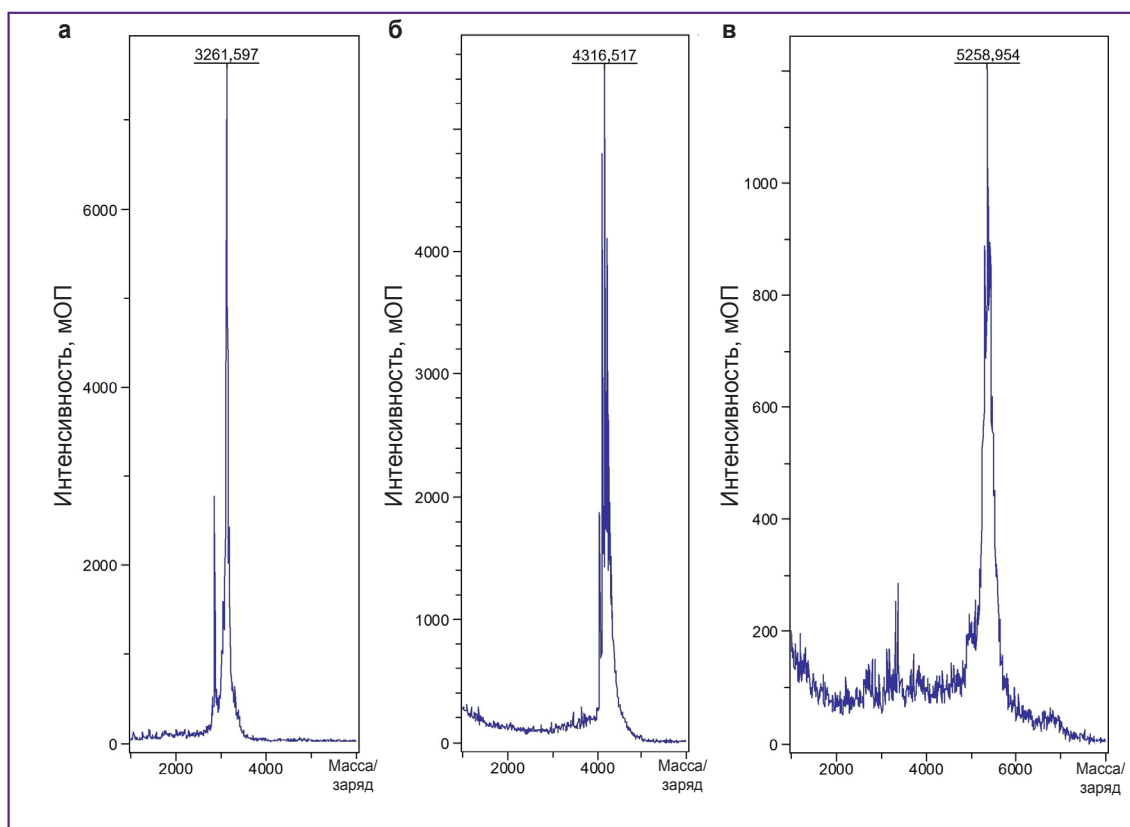


Рис. 1. Масс-спектрограммы GRP (а), U5-Sth1a (б) и BBN/C1-C2 (в)

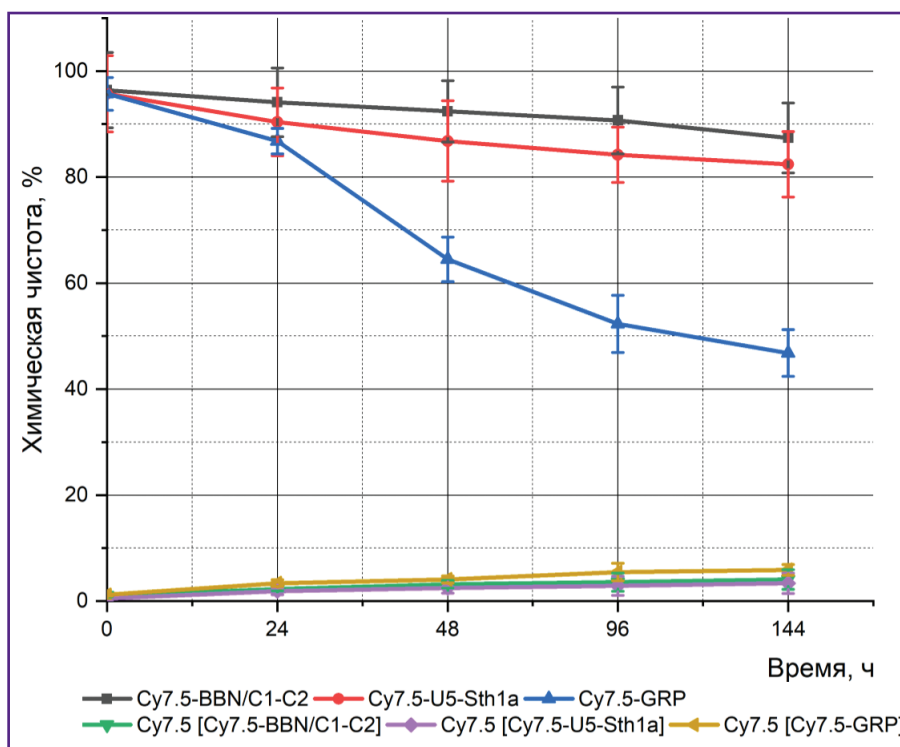


Рис. 2. Химическая стабильность пептидов Cy7.5-GRP, Cy7.5-BBN/C1-C2 и Cy7.5-U5-Sth1a, а также комплексов Cy7.5-пептид в процессе инкубации в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) при 37°C

Указан процент свободного красителя в пробе на момент измерения

Рис. 3. Распределение Cy7.5-GRP (а, з), Cy7.5-U5-Sth1a (б, д) и Cy7.5-BBN/C1-C2 (в, е) в проекции органов у мышей Nu/Nu через 2 дня (а–в) и 5 дней (з–е) после внутривенной инъекции в дозе 19 нмоль/кг

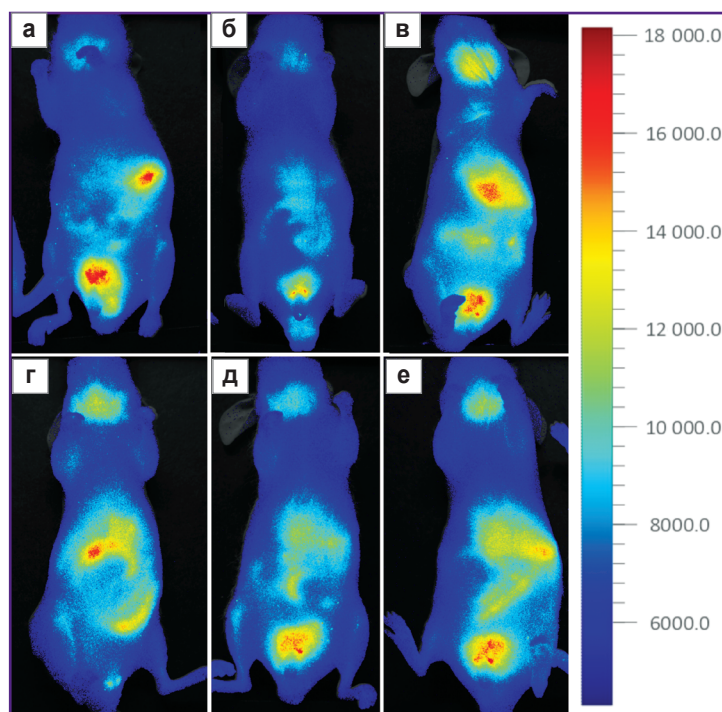
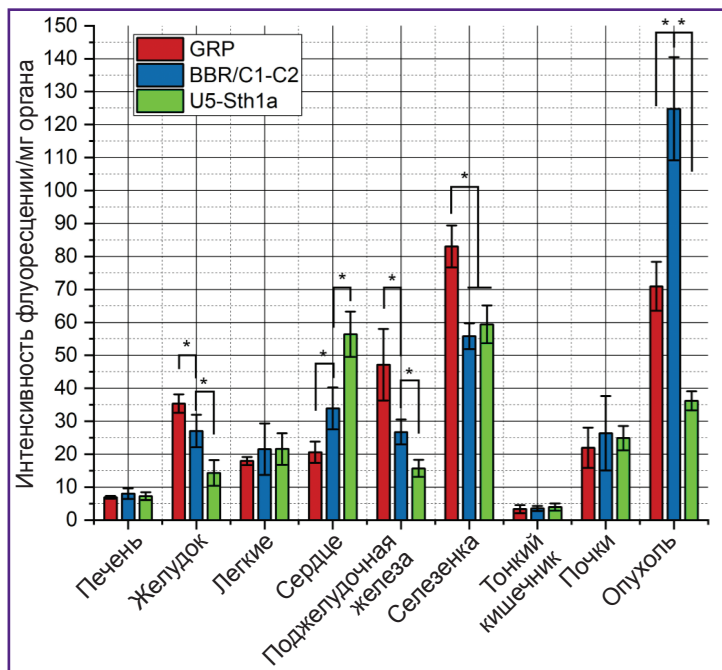


Рис. 4. Полуколичественный анализ распределения GRP, BBR/C1-C2 и U5-Sth1a в дозе 19 нмоль/кг в основных органах на 5-е сутки после их введения

Полуколичественный анализ основан на нормализации интенсивности флуоресценции с массой органа. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение; * $p < 0,01$



сигнал остатков корма). U5-Sth1a и BBR/C1-C2 также продолжали выводиться мочевыми пузырями, однако сигнал в проекции желудка, поджелудочной железы, селезенки и печени оставался повышенным.

При анализе биораспределения на 5-е сутки после внутривенного введения пептидов наблюдалась следующая картина (рис. 4). Анализировали основные органы. Интенсивность сигнала флуоресценции органа была интегрирована, уменьшена с фоновым шумом и нормализована с массой органа. Основным органом накопления всех трех пептидов — селезенка.

Короткий пептид GRP помимо селезенки локализовался в желудке и поджелудочной железе. Сигнал BBN/C1-C2 детектировался в данных органах значительно слабее, но был выше, чем сигнал токсина U5-Sth1a. Особо стоит отметить повышенный сигнал флуоресценции токсина U5-Sth1a и пептида BBN/C1-C2 в сердце (хотя и в меньшей степени), что, вероятно, связано с природной мишенью выбранного токсина. В остальных органах сигнал для всех трех молекул детектировался равномерно.

Отдельно рассматривалась локализация меченых

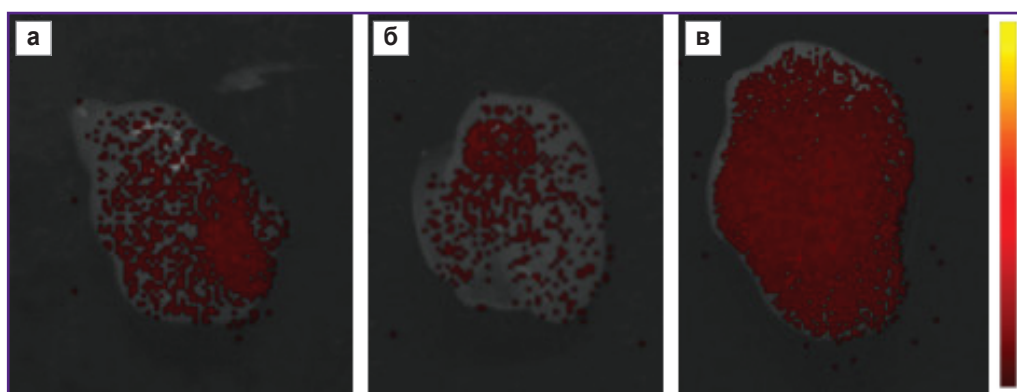


Рис. 5. Визуализация опухоли при введении Cy7.5-GRP (а), Cy7.5-U5-Sth1a (б) и Cy7.5-BBN/C1-C2 (в) на 5-е сутки

пептидов в опухоли на 2-е и 5-е сутки (рис. 5). Видно, что на 2-е сутки GRP детектировался в опухоли в большей степени, чем BBN/C1-C2, однако на 5-е сутки картина изменилась. Сигнал BBN/C1-C2 стал значительно превышать сигнал GRP.

Обсуждение

Пептиды семейства бомбезинов действуют как факторы роста для различных типов опухолей. Бомбезин и его аналог у млекопитающих — GRP — имеют структурное и функциональное сходство. Оба пептида выполняют функции желудочно-кишечных гормонов, нейротрансмиттеров, а также аутокринных факторов роста для опухолевых клеток [15]. Поскольку рецепторы GRPR сверхэкспрессируются в различных опухолях, GRP и BBN активно исследуются в качестве диагностических и терапевтических лигандов, нацеленных на опухолевые клетки. Например, было показано значительное накопление пептидов в клетках линий PC-3, DU-145, MDA-MB-231, T-47-D, HeLa [16, 17].

Ключевой особенностью этих пептидов является их способность интернализироваться внутрь клеток, выступая в роли агонистов рецептора. На ранних этапах разработки фармпрепаратов данная особенность считалась важным условием для высокого и длительного поглощения препарата опухолью [18, 19]. Однако в настоящее время это представляется существенным недостатком, поскольку радиоактивно-меченые агонисты обеспечивают высокое поглощение радионуклеотидов. Еще одним существенным недостатком лигандов на основе агонистов GRPR является их поглощение нормальными неопухолевыми клетками, в частности клетками поджелудочной железы. Так, мощный агонист GRPR — AMBA (DOTA-Gly-4-аминобензоил-BBN(7–14)) — демонстрирует отличные результаты при визуализации и терапии в моделях с ксенотрансплантатами рака предстательной и молочной желез [20, 21], что делает его одним из эффективных аналогов бомбезина, прошедших широкий

спектр клинических испытаний. Несмотря на это, у пациентов, получавших лечение AMBA, наблюдалось значительное поглощение препарата поджелудочной железой и желудочно-кишечным трактом [22]. Кроме того, исследование фазы I, проведенное у пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком простаты, было прекращено из-за серьезных побочных эффектов, вызванных активацией GRPR после инъекции терапевтических доз [23].

Стимулирующие эффекты агонистов бомбезина при нескольких видах рака у человека сформировали новый виток в разработке антагонистов GRPR в качестве противоопухолевых препаратов, способных связываться с рецептором с высокой степенью сродства без его активации. Обширные исследования [24–26] взаимосвязи структуры и биологической активности привели к появлению различных антагонистов GRPR, полученных путем модификации пептидного остова нативных мотивов BBN или GRP. К таким модификациям относят усечения последнего С-концевого метионина, алкиламидирование, этерификацию открытой карбоксильной группы предпоследнего остатка, уменьшение пептидных связей, а также замену ключевых аминокислот их D-аналогами или другими остатками. Это способствовало появлению множества мощных антагонистов GRPR, демонстрирующих антипролиферативную активность в клетках млекопитающих, экспрессирующих GRPR, а также в опухолях у мышей [17].

На следующем этапе разработок выявляется еще одна существенная проблема пептидных лигандов, нацеленных на GRPR. Низкая протеолитическая стабильность служит ключевым фактором в разработке фармпрепарата независимо от его биологической функции в роли агониста или антагониста. Модификации, связанные с превращением агониста в антагониста, частично, но недостаточно решают данную проблему [8, 27–30]. В нашем исследовании в качестве стабилизирующей молекулы был использован кноттин — токсин, который способен формировать цистиновый узел, стабилизированный

несколькими дисульфидными связями, за счет наличия нескольких остатков цистеина. Молекула бомбезина (BBN) была помещена между первым и вторым цистеином с целью повысить стабильность, поскольку отличительной особенностью кноттинов является протеолитическая устойчивость. Однако, встраиваясь в относительно крупную молекулу токсина, бомбезин теряет способность интернализироваться внутрь клетки. В предыдущем исследовании [12] мы показали, что BBN/C1-C2 обладает повышенной химической стабильностью с сохранением способности связываться с GRPR на поверхности клеток без интернализации внутрь. В данном исследовании мы проанализировали биораспределение BBN/C1-C2 *in vivo* и способность связываться с клетками опухоли. Исследование проводилось при сравнении BBN/C1-C2 с коротким пептидом GRP и токсином U5-Sth1a, на основе которых была создана молекула BBN/C1-C2.

Показано, что зоной локализации пептида GRP, нацеленного на GRPR, являются желудок и поджелудочная железа (см. рис. 3 и 4). Пептид BBR/C1-C2 также наблюдается в данных органах, но в меньшей степени. Анализ динамики интенсивности флуоресценции в опухоли дополнительно подтверждает таргетность BBN/C1-C2. На 5-е сутки после введения также фиксировался повышенный сигнал BBN/C1-C2 относительно GRP (см. рис. 5). Однако возникает проблема, связанная с использованием кноттина в качестве каркаса для стабилизации бомбезина. Токсины из яда членистоногих (U5-Sth1a из паука *Scytodes thoracica*) имеют определенную биологическую мишень. В основном такая мишень ограничивается конкретным ионным каналом (потенциал-зависимые кальциевые, натриевые, калиевые и т.д.). При взаимодействии с каналом-мишенью токсины либо вызывают его закрытие, либо модулируют его проводимость. В конечном итоге такое взаимодействие ведет к изменению мембранного потенциала и концентрации ионов в клетках. В нашем случае для токсина U5-Sth1a неизвестна биологическая мишень. Однако по параллельным исследованиям команды было выяснено, что вероятной мишенью токсина служат кальциевые потенциал-зависимые каналы, а сам токсин выступает в роли блокатора [31]. Поскольку местом локализации потенциал-зависимых кальциевых каналов является в том числе и сердечная мышца (а также гладкие миоциты в стенках сосудов и любых полых органах, таких как желудок, кишечник, мочевого пузыря и др.) [32], то мы видим, что не только токсин крепится в области сердца (см. рис. 4), но и BBN/C1-C2, хотя и в значительно меньшей степени.

Заключение

Нам удалось получить стабильную молекулу, содержащую бомбезин, заключенный в каркас кнот-

тина, способную длительное время удерживаться на поверхности опухоли, экспрессирующей GRPR, не интернализируясь внутрь. Однако, поскольку в качестве каркаса использовался токсин U5-Sth1a, тропный к ионным каналам, у полученной молекулы сохранился домен, отвечающий за прикрепление к каналу-мишени и характерный для кноттина. Это может в будущем, при использовании молекулы в качестве лиганда для радиотерапии, увеличить радиационную нагрузку на сердце пациента. В связи с этим молекула BBN/C1-C2 требует дополнительного исследования.

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. 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>.
2. Shimoda J. Effects of bombesin and its antibody on growth of human prostatic carcinoma cell lines. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1992; 83(9): 1459–1468, <https://doi.org/10.5980/jpnjurol1989.83.1459>.
3. D'Onofrio A., Engelbrecht S., Läppchen T., Rominger A., Gourni E. GRPR-targeting radiotheranostics for breast cancer management. *Front Med (Lausanne)* 2023; 10: 1250799, <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1250799>.
4. Liu P., Tu Y., Tao J., Liu Z., Wang F., Ma Y., Li Z., Han Z., Gu Y. GRPR-targeted SPECT imaging using a novel bombesin-based peptide for colorectal cancer detection. *Biomater Sci* 2020; 8(23): 6764–6772, <https://doi.org/10.1039/d0bm01432j>.
5. Kähkönen E., Jambor I., Kemppainen J., Lehtiö K., Grönroos T.J., Kuisma A., Luoto P., Sipilä H.J., Tolvanen T., Alanen K., Silén J., Kallajoki M., Roivainen A., Schäfer N., Schibli R., Dragic M., Johayem A., Valencia R., Borkowski S., Minn H. In vivo imaging of prostate cancer using [68Ga]-labeled bombesin analog BAY86-7548. *Clin Cancer Res* 2013; 19(19): 5434–5443, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3490>.
6. Stoykow C., Erbes T., Maecke H.R., Bulla S., Bartholomä M., Mayer S., Drendel V., Bronsert P., Werner M., Gitsch G., Weber W.A., Stickeler E., Meyer P.T. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in breast cancer using the receptor antagonist (68)Ga-RM2 and PET. *Theranostics* 2016; 6(10): 1641–1650, <https://doi.org/10.7150/thno.14958>.
7. Kurth J., Krause B.J., Schwarzenböck S.M., Bergner C., Hakenberg O.W., Heuschkel M. First-in-human dosimetry of gastrin-releasing peptide receptor antagonist [177Lu]Lu-RM2: a radiopharmaceutical for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J*

Nucl Med Mol Imaging 2020; 47(1): 123–135, <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04504-3>.

8. Nock B.A., Kaloudi A., Lymperis E., Giarika A., Kulkarni H.R., Klette I., Singh A., Krenning E.P., de Jong M., Maina T., Baum R.P. Theranostic perspectives in prostate cancer with the gastrin-releasing peptide receptor antagonist NeoBOMB1: preclinical and first clinical results. *J Nucl Med* 2017; 58(1): 75–80, <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178889>.

9. Linder K.E., Metcalfe E., Arunachalam T., Chen J., Eaton S.M., Feng W., Fan H., Raju N., Cagnolini A., Lantry L.E., Nunn A.D., Swenson R.E. In vitro and in vivo metabolism of Lu-AMBA, a GRP-receptor binding compound, and the synthesis and characterization of its metabolites. *Bioconjug Chem* 2009; 20(6): 1171–1178, <https://doi.org/10.1021/bc9000189>.

10. Lymperis E., Kaloudi A., Sallegger W., Bakker I.L., Krenning E.P., de Jong M., Maina T., Nock B.A. Radiometal-dependent biological profile of the radiolabeled gastrin-releasing peptide receptor antagonist SB3 in cancer theranostics: metabolic and biodistribution patterns defined by neprilysin. *Bioconjug Chem* 2018; 29(5): 1774–1784, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00225>.

11. Nock B.A., Kaloudi A., Kanellopoulos P., Janota B., Bromińska B., Iżycki D., Mikołajczak R., Czepczynski R., Maina T. [99mTc]Tc-DB15 in GRPR-targeted tumor imaging with SPECT: from preclinical evaluation to the first clinical outcomes. *Cancers (Basel)* 2021; 13(20): 5093, <https://doi.org/10.3390/cancers13205093>.

12. Beloborodov E.A., Iurova E.V., Fomin A.N., Saenko Y.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>.

13. El-Gogary R.I., Rubio N., Wang J.T., Al-Jamal W.T., Bourgognon M., Kafa H., Naeem M., Klippstein R., Abbate V., Leroux F., Bals S., Van Tendeloo G., Kamel A.O., Awad G.A., Mortada N.D., Al-Jamal K.T. Polyethylene glycol conjugated polymeric nanocapsules for targeted delivery of quercetin to folate-expressing cancer cells in vitro and in vivo. *ACS Nano* 2014; 8(2): 1384–1401, <https://doi.org/10.1021/nn405155b>.

14. Wang C., Pulli B., Jalali Motlagh N., Li A., Wojtkiewicz G.R., Schmidt S.P., Wu Y., Zeller M.W.G., Chen J.W. A versatile imaging platform with fluorescence and CT imaging capabilities that detects myeloperoxidase activity and inflammation at different scales. *Theranostics* 2019; 9(25): 7525–7536, <https://doi.org/10.7150/thno.36264>.

15. Cuttitta F., Carney D.N., Mulshine J., Moody T.W., Fedorko J., Fischler A., Minna J.D. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 1985; 316(6031): 823–826, <https://doi.org/10.1038/316823a0>.

16. Begum A.A., Moyle P.M., Toth I. Investigation of bombesin peptide as a targeting ligand for the gastrin releasing peptide (GRP) receptor. *Bioorg Med Chem* 2016; 24(22): 5834–5841, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.039>.

17. Okarvi S.M., Jammaz I.A. Preparation and evaluation of bombesin peptide derivatives as potential tumor imaging agents: effects of structure and composition of amino acid sequence on in vitro and in vivo characteristics. *Nucl*

Med Biol 2012; 39(6): 795–804, <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.01.002>.

18. Maina T., Nock B.A. From bench to bed: new gastrin-releasing peptide receptor-directed radioligands and their use in prostate cancer. *PET Clin* 2017; 12(2): 205–217, <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2016.12.002>.

19. 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>.

20. Maddalena M.E., Fox J., Chen J., Feng W., Cagnolini A., Linder K.E., Tweedle M.F., Nunn A.D., Lantry L.E. 177Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. *J Nucl Med* 2009; 50(12): 2017–2024, <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.064444>.

21. Wild D., Frischknecht M., Zhang H., Morgenstern A., Bruchertseifer F., Boisclair J., Provencher-Bolliger A., Reubi J.C., Maecke H.R. Alpha- versus beta-particle radiopeptide therapy in a human prostate cancer model (213Bi-DOTA-PESIN and 213Bi-AMBA versus 177Lu-DOTA-PESIN). *Cancer Res* 2011; 71(3): 1009–1018, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1186>.

22. Baum R., Prasad V., Mutloka N., Frischknecht M., Maecke H., Reubi J.C. Molecular imaging of bombesin receptors in various tumors by Ga-68 AMBA PET/CT: first results. *J Nucl Med* 2007; 48(Suppl 2): 79.

23. Bodei L., Ferrari M., Nunn A., Llull J., Cremonesi M., Martano L., Laurora G., Scardino E., Tiberini S., Bufi G., Eaton S., de Cobelli O., Paganelli G. Lu-177-AMBA bombesin analogue in hormone refractory prostate cancer patients: a phase I escalation study with single-cycle administrations. *Eur J Nucl Med Mol* 2007; 34 (Suppl S2): S221.

24. Cornelio D.B., Roesler R., Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 2007; 18(9): 1457–1466, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm058>.

25. Kenakin T. The potential for selective pharmacological therapies through biased receptor signaling. *BMC Pharmacol Toxicol* 2012; 13: 3, <https://doi.org/10.1186/2050-6511-13-3>.

26. Thundimadathil J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J Amino Acids* 2012; 2012: 967347, <https://doi.org/10.1155/2012/967347>.

27. Hoppenz P., Els-Heindl S., Beck-Sickingher A.G. Identification and stabilization of a highly selective gastrin-releasing peptide receptor agonist. *J Pept Sci* 2019; 25(12): e3224, <https://doi.org/10.1002/psc.3224>.

28. Valverde I.E., Bauman A., Kluba C.A., Vomstein S., Walter M.A., Mindt T.L. 1,2,3-triazoles as amide bond mimics: triazole scan yields protease-resistant peptidomimetics for tumor targeting. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52(34): 8957–8960, <https://doi.org/10.1002/anie.201303108>.

29. De K., Banerjee I., Sinha S., Ganguly S. Synthesis and exploration of novel radiolabeled bombesin peptides for targeting receptor positive tumor. *Peptides* 2017; 89: 17–34, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.01.002>.

30. Tu Y., Tao J., Wang F., Liu P., Han Z., Li Z., Ma Y., Gu Y. A novel peptide targeting gastrin releasing peptide

receptor for pancreatic neoplasm detection. *Biomater Sci* 2020; 8(9): 2682–2693, <https://doi.org/10.1039/d0bm00162g>.

31. Iurova E., Beloborodov E., Tazintseva E., Fomin A., Shutov A., Slesarev S., Saenko Y., Saenko Y. Arthropod toxins inhibiting Ca²⁺ and Na⁺ channels prevent AC-1001 H3 peptide-induced apoptosis. *J Pept Sci* 2021; 27(1): e3288, <https://doi.org/10.1002/psc.3288>.

32. Аронов Д.М., Лупанов В.П. Антагонисты кальция в лечении больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Фокус на амлодипин. *Русский медицинский журнал* 2007; 15(4): 275–281.

Aronov D.M., Lupanov V.P. Calcium antagonists in the treatment of patients with cardiovascular diseases. Focus on amlodipine. *Russkij medicinskij zurnal* 2007; 15(4): 275–281.