

УДК 574/577

DOI 10.23648/UMBJ.2018.31.17227

РАЗРАБОТКА И СИНТЕЗ ПЕПТИДА, ТРОПНОГО К ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОМУ ПОВЕРХНОСТНОМУ АНТИГЕНУ*

Д.А. Лямина, Е.В. Юрова, А.В. Хохлова,
Е.В. Расторгуева, Е.А. Белобородов, О.В. Толочманова

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

e-mail: daryaantonovna@yandex.ru

Рак предстательной железы является наиболее часто диагностируемым раком у мужчин и второй ведущей причиной смертности от рака у мужчин старше 50 лет. Экспрессия простатического специфического мембранного антигена в эпителиальных клетках предстательной железы непосредственно лежит в основе развития опухоли простаты in vivo. Использование позитронно-эмиссионной томографии и радионуклидной терапии в диагностике и лечении рака простаты является очень перспективным. Таким образом, создание радиофармацевтических препаратов на основе пептидов, тропных к ПСМА, является наиболее актуальным.

Цель. Подбор пептида, обладающего тропностью к простат-специфическому поверхностному антигену, и хелатора, отвечающего критериям стабильности.

Материалы и методы. В работе использовалась клеточная линия аденокарциномы предстательной железы LNCaP. Синтез пептидов осуществлялся на пептидном синтезаторе IntavisRSi. Для изучения свойств пептида проводились NAALADase-анализ, молекулярный докинг и определение значений IC50 к клеткам клеточной линии LNCaP.

Результаты. Значения IC50 для определения аффинности связывания вычислялись для каждого хелатора, связанного с изучаемым пептидом. Значение IC50 при конъюгации пептида с хелатором DOTA равно 2,46 нМ. При связывании пептида с клетками клеточной линии LNCaP значение IC50 достигает 36 нМ. Молекулярный докинг показал, что пептид взаимодействует с активным центром молекулы простат-специфического мембранного антигена DockingScore 4,176.

Выводы. В результате экспериментов было выявлено, что наибольшей способностью к связыванию друг с другом обладают пептид «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» и хелатор DOTA. Продемонстрировано, что изучаемый пептид имеет высокое сродство с раковыми клетками линии рака предстательной железы LNCaP.

Ключевые слова: пептид, предстательная железа, радиофармацевтический препарат, ПСМА, ПСА.

Введение. Несмотря на огромный прогресс, достигнутый в последние годы в онкологии, рак предстательной железы по-прежнему представляет собой основную причину смертности у мужчин. За последние 10 лет рак предстательной железы стал второй ведущей причиной смерти от рака у мужчин [1, 2].

В настоящее время создание новых типов

противоопухолевых и диагностических препаратов на основе лигандов – природных и искусственных пептидов, способных селективно связываться с раковыми клетками, является одним из активно развивающихся направлений в современной медицине [3]. Поиск и получение таких органо- и тканеспецифических пептидов проводят с использованием комбинаторных пептидных библиотек или матричных пептидных технологий. Ключевым моментом этих технологий отбора является способность

* Работа выполнена при поддержке конкурса «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («УМНИК»), грант № 9522ГУ/2015.

получать высокоспецифичные пептиды-лиганды к определенной мишени при отсутствии информации об этой мишени. Данный метод позволяет проводить селекцию опухоль-адресованных пептидов как *in vitro* на культурах раковых клеток, так и *in vivo* на опухолевых моделях. Такие пептиды обладают высокими коэффициентами проникновения в опухоль, низкой иммуногенностью, высокой аффинностью к мишени, относительной стабильностью и являются удобными объектами для конъюгирования с другими веществами разной химической природы, в т.ч. с радиоактивными изотопами. Таким образом, использование пептидов в диагностических радиофармпрепаратах (РФП) является современным и оправданным подходом [4].

В настоящее время диагностические РФП состоят из бифункционального комплексообразователя, к которому посредством координационных связей прикрепляется радиоизотоп, а посредством ковалентной связи – пептид, выступающий в качестве лиганда. В нашем случае в аналогичных диагностических РФП используется пептид-лиганд к простатическому специфическому мембранному антигену. Однако недостатком ныне существующих диагностических РФП является то, что пока не найдены поверхностные белковые молекулы, экспрессирующиеся только на поверхности раковых клеток. Простатический специфический мембранный антиген (ПСМА) экспрессируется как на поверхности нормальных клеток, так и на поверхности раковых клеток [5]. ПСМА в ряде случаев вообще может не появляться на поверхности клеток рака простаты или может находиться внутри них. Диагностическая ценность ПСМА связана с тем, что они появляются на поверхности нормальных клеток в меньших количествах [6, 7]. Потенциал совершенствования диагностических РФП заключается в использовании пептидов-лигандов, тропных к разным рецепторам, экспрессирующимся на поверхности раковых

клеток.

Цель исследования. Подбор пептида, обладающего тропностью к простат-специфическому поверхностному антигену, и хелатора, отвечающего критериям стабильности.

Материалы и методы. В работе использовалась клеточная линия аденокарциномы предстательной железы LNCaP. Синтез пептидов осуществлялся на пептидном синтезаторе ResPer SL (Intavis, Германия) в соответствии с протоколами производителя.

NAALADase-анализ. Рекомбинантный человеческий ПСМА разводили до 0,4 мкг/мл в буфере для анализа (50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,5). Субстрат разбавляли до концентрации 40 мкМ в буфере для анализа. Немеченые соединения были разведены в объеме 30 мкл с концентрацией от 0 до 1000 нМ в аналитическом буфере. Затем 60 мкл раствора ПСМА и 30 мкл раствора субстрата были добавлены в каждую тестируемую смесь. Далее проводили инкубацию при 37 °C в течение одного часа, а затем реакцию останавливали путем нагревания до 95 °C в течение 15 мин. 120 мкл 15 mM раствора ортофталдальдегида (ОРА) в ОРА-буфере (0,2 M NaOH, 0,1 % β-меркаптоэтанола) добавляли в каждую пробирку и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. 100 мкл реакционной смеси помещали в планшет и измеряли флуориметром длину волны излучения 330 нм и длину волны эмиссии 450 нм. Каждое соединение было измерено по меньшей мере три раза.

Определение значений IC50 к клеткам клеточной линии LNCaP. Планшеты с клетками инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в 100 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS) с 1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) на лунку. После удаления питательной среды с PBS и BSA к клеткам клеточной линии LNCaP в концентрации 10⁵ добавляли по 50 мкл среды DMEM/F12 («Панэко», Россия). Различные концентрации немеченого соединения в 300 мкл DMEM/F12 смешивали с 3 мкл 150 нМ раствора 125I-MIP-1095 в DMEM/F12.

Добавляли 50 мкл полученного раствора в каждую лунку. В итоге каждая лунка содержала радиоактивно меченный лиганд в концентрации 0,75 нМ и конкурентный немеченый лиганд в концентрации, упомянутой выше. Затем планшет инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре с перемешиванием. После инкубации клетки отмывали 2 ч с 100 мкл охлажденного на льду PBS и 1 ч с 200 мкл холодного PBS. Затем фильтры были собраны, и производилось измерение радиоактивности с помощью гамма-счетчика. Каждая лунка была измерена в течение 5 мин. Значение связывания пептида рассчитывали с помощью уравнения Ченга-Прусса [8].

Было изучено связывание пептида с хелаторами DOTA, NOTA, DTPA, CHX-A-DTPA, PCTA, DO3A, NODAGA, CIM (Sigma-Aldrich, США). Хелаторы были связаны с линкером путем твердофазного синтеза. ПСМА в сочетании со смолой был деблокирован с использованием 20 % пиперидина в ДМФ. В зависимости от реакционной способности вещества от 2 до 4 эквивалентов хелатора, NATU и 10 эквивалентов DIPEA, растворенного в 500 мкл ДМФ, были сме-

шаны и проинкубированы в течение 16 ч. Эксперимент контролировали методом ВЭЖХ на хроматографе NGC-Chromatography System (Bio-Rad, США). Затем пептид отсоединяли от смолы с помощью смеси, которая содержала 95 % трифторуксусной кислоты, 2,5 % воды и 2,5 % триизопропилсилана.

Все эксперименты и определения параметров были выполнены с 3-кратным повторением. Результаты выражали как среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Для оценки статистической значимости различий применяли t-критерий Стьюдента для парных переменных. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В ходе экспериментов были изучены способность связывания пептида с хелатором и стабильность комплекса «пептид-хелатор». В лабораторных условиях значение IC_{50} определяли путем связывания очищенного хелатора с синтезированными пептидами. Была определена аффинность соединений с синтезированными пептидами в ингибирующей концентрации 50 %, т.е. значения IC_{50} . Данный показатель варьировался от 0,95 до 2,6 нМ.

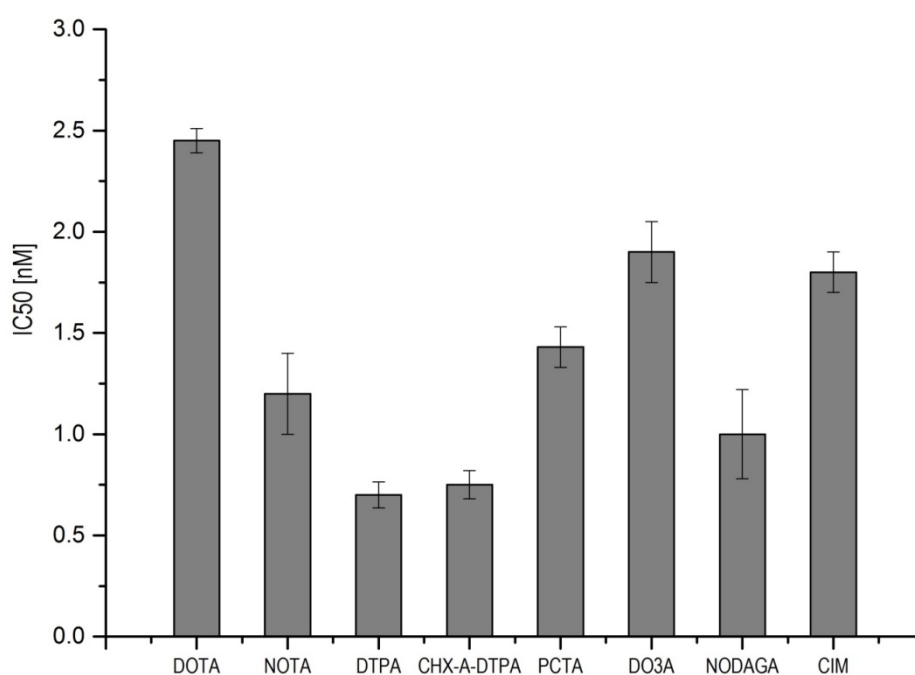


Рис. 1. Значения IC50 при связывании пептида «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей», тропного к ПСМА, с различными хелаторами

На рис. 1 представлены данные, отражающие эффективность связывания пептида «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-

Вал-Фен-Лей», тропного к ПСМА, с хелаторами DOTA, NOTA, DTPA, CHX-A-DTPA, PCTA, DO3A, NODAGA, CIM. Из диаграммы видно, что наиболее активная конъюгация наблюдалась между пептидом «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» и хелаторами DOTA и DO3A, значения IC50 равны 2,46 и 1,9 нМ

соответственно. Наилучшие результаты конъюгации получены для пептида «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» и хелатора DOTA.

Далее был проведен анализ связывания комплекса «пептид-хелатор» с раковыми клетками предстательной железы. В эксперименте использовалась клеточная линия аденокарциномы предстательной железы LNCaP. Определялась величина IC50 при связывании комплекса «пептид-хелатор» с клетками клеточной линии LNCaP.

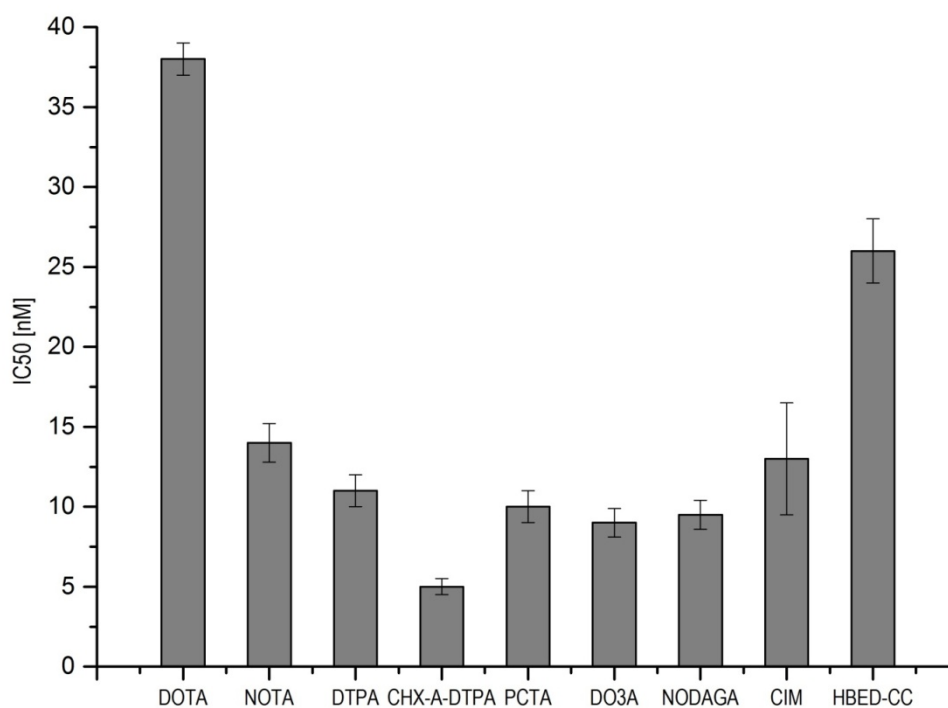


Рис. 2. Значения IC50 при связывании пептида «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей», тропного к ПСМА, с раковыми клетками клеточной линии LNCaP

На рис. 2 представлены данные, отражающие значения IC50 при связывании пептида «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» с клетками клеточной линии LNCaP. Наиболее стабильное соединение наблюдалось у пептида «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» с хелатором DOTA. Значения IC50 в данном эксперименте достигали 36 нМ.

В результате данного эксперимента было показано, что наиболее эффективно с мембранами раковых клеток предстательной железы связывается пептид «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей», тропный к ПСМА, с хелатором DOTA.

На рис. 3 представлена компьютерная модель внеклеточного домена ПСМА. Как видно, белок ПСМА имеет сложную структуру с центральным расположением

активного центра, в котором происходит гидролиз субстратов. ПСМА представляет собой фермент глутаматкарбоксипептидазу 2 (GCP2). GCP2 катализирует гидролиз N-ацетиласпартил-глутамата до глутамата и N-ацетиласпартата, а также участвует в метаболизме фолатов. Для выяснения механизмов связывания пептида «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» с внеклеточным доменом простат-специфического

мембранного антигена нами были проведены эксперименты по оценке взаимодействия пептида и ПСМА. Молекулярный докинг выполнялся с использованием электронного ресурса BSP-SLIM [9]. Как видно из рис. 4, пептид «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» взаимодействует с активным центром молекулы простат-специфического мембранного антигена DockingScore 4,176.

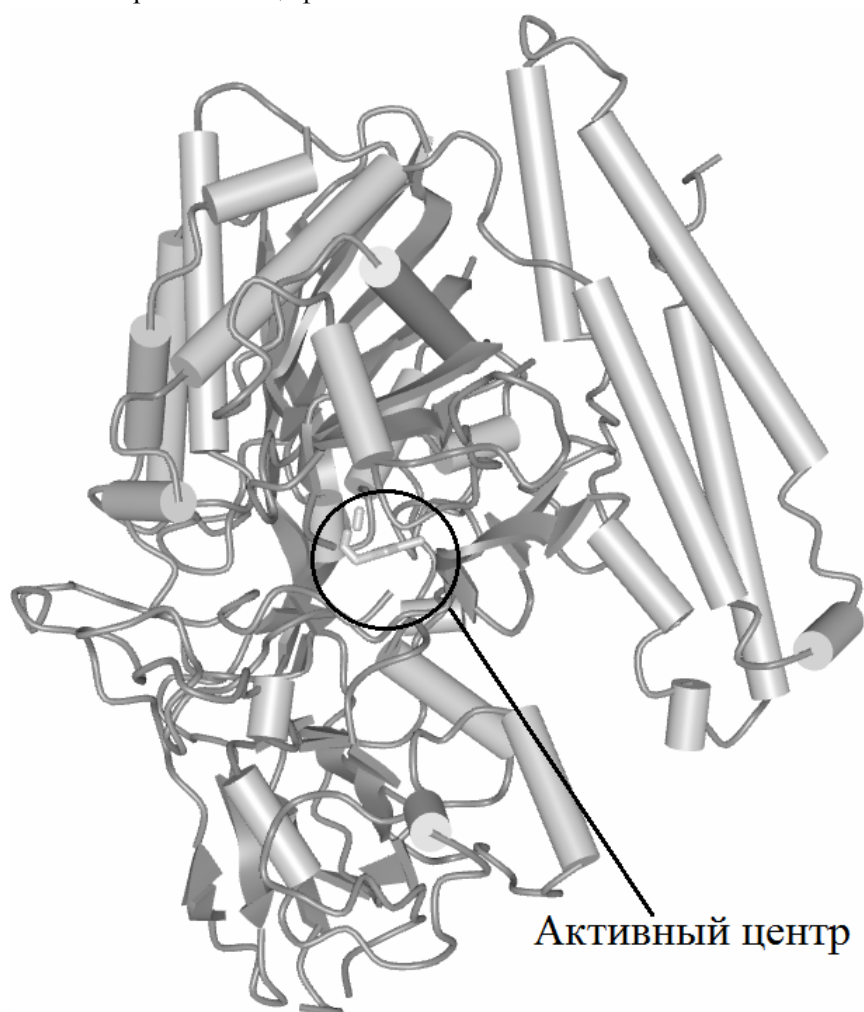


Рис. 3. Компьютерная модель внеклеточного домена ПСМА

Заключение. В ходе выполнения работы был подобран и синтезирован пептид и хелатор к данному пептиду. Синтез пептида проводился на пептидном синтезаторе ResPer SL. На основе методики определения значений IC_{50} был проведен анализ конъюгации хелаторов DOTA, NOTA, DTPA, CHX-A-DTPA, PCTA, DO3A, NODAGA, CIM

с выбранным пептидом. В результате эксперимента на основе полученных данных был сделан вывод о том, что наибольшей способностью к связыванию друг с другом обладают пептид «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» и хелатор DOTA.

Для проверки эффективности связывания

пептида с простат-специфическим поверхностным антигеном были использованы клетки аденокарциномы предстательной железы клеточной линии LNCaP. В ходе исследования было показано, что наилучшим связыванием с простат-специфическим поверхностным антигеном обладает комплекс «пептид «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей»-ДОТА».

Для изучения стабильности комплекса «пептид-ДОТА» был проведен

молекулярный докинг с использованием программного обеспечения BSP-SLIM. Таким образом, экспериментальные исследования продемонстрировали, что наиболее высокое сродство с раковыми клетками линии рака простаты LNCaP имеет пептид «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей».



Пептид А1

Рис. 4. Графическая модель молекулярного докинга пептида «Глу-Вал-Про-Арг-Лей-Сер-Лей-Лей-Ала-Вал-Фен-Лей» и ПСМА

Литература

1. Michael M. Shen, Cory Abate-Shen. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010; 24 (18): 1967–2000. DOI: 10.1101/gad.1965810.
2. Shuai Gao, Chen-Lin Hsieh, Meenakshi Bhansali, Archana Kannan, Lirim Shemshedini. A Peptide against Soluble Guanylyl Cyclase $\alpha 1$: A New Approach to Treating Prostate Cancer. *PLoS One.* 2013; 8 (5): e64189. DOI: 10.1371/journal.pone.0064189.
3. Jintang He, Xuefei Sun, Tujin Shi, Athena A. Schepmoes, Thomas L. Fillmore, Vladislav A. Petyuk, Fang Xie, Rui Zhao, Marina A. Gritsenko, Feng Yang, Naoki Kitabayashi, Sung-Suk Chae, Mark A. Rubin, Javed Siddiqui, John T. Wei, Arul M. Chinnaiyan, Wei-Jun Qian, Richard D. Smith,

- Jacob Kagan, Sudhir Srivastava, Karin D. Rodland, Tao Liu, David G. Camp.* Antibody-independent targeted quantification of TMPRSS2-ERG fusion protein products in prostate cancer. *Mol. Oncol.* 2014; 8 (7): 1169–1180. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.02.004.
4. *Yu-Feng Xiao, Meng-Meng Jie, Bo-Sheng Li, Chang-Jiang Hu, RuiXie, Bo Tang, Shi-Ming Yang.* Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015: 761820. DOI: 10.1155/2015/761820.
 5. *Aaron M. LeBeau, Maya Kostova, Charles S. Craik, Samuel R. Denmeade.* Prostate-specific antigen: an overlooked candidate for the targeted treatment and selective imaging of prostate cancer. *Biol. Chem.* 2010; 391 (4): 333–343. DOI: 10.1515/BC.2010.044.
 6. *Ákos Végvári, Karin Sjödin, Melinda Rezeli, Johan Malm, Hans Lilja, Thomas Laurell, György Marko-Varga.* Identification of a Novel Proteoform of Prostate Specific Antigen (SNP-L132I) in Clinical Samples by Multiple Reaction Monitoring. *Mol. Cell Proteomics.* 2013; 12 (10): 2761–2773. DOI: 10.1074/mcp.M113.028365.
 7. *Aaron M. LeBeau, Samuel R. Denmeade.* Protease-Activated Pore-Forming Peptides for the Treatment and Imaging of Prostate Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2015; 14 (3): 659–668. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0744.
 8. *Matej Janeček, Maxim Rossmann, Pooja Sharma, Amy Emery, David J. Huggins, Simon R. Stockwell, Jamie E. Stokes, Yaw S. Tan, Estrella Guarino Almeida, Bryn Hardwick, Ana J. Narvaez, Marko Hyvönen, David R. Spring, Grahame J. McKenzie, Ashok R. Venkitaramana.* Allosteric Modulation of AURKA Kinase Activity by a Small-Molecule Inhibitor of Its Protein-Protein Interaction with TPX2. *Scientific Reports.* 2016; 6: 28528. DOI: 10.1038/srep28528.
 9. *Hui Sun Lee, Yang Zhang.* BSP-SLIM: A blind low-resolution ligand-protein docking approach using theoretically predicted protein structures. *Proteins.* 2012; 80: 93–110. DOI: 10.1002/prot.23165.

DEVELOPMENT AND SYNTHESIS OF PEPTIDE WITH TROPISM TO PROSTATE-SPECIFIC SURFACE ANTIGEN

**D.A. Lyamina, E.V. Yurova, A.V. Khokhlova,
E.V. Rastorgueva, E.A. Beloborodov, O.V. Tolochmanova**

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

e-mail: daryaantonovna@yandex.ru

Prostate cancer is the most common cancer in men and the second major cause of cancer death in men over 50. Expression of the prostatic specific membrane antigen in the epithelial cells of the prostate gland directly underlies the development of prostate cancer in vivo. Positron emission tomography and radionuclide therapy in the diagnosis and treatment of prostate cancer is very promising. Thus, the development of radiopharmaceuticals based on peptides with tropism to PSA is relevant.

The objective of the paper is to select a peptide with tropism to prostate-specific surface antigen, and a chelator that meets the stability criteria.

Materials and Methods. The cell line of LNCaP prostatic adenocarcinoma was used during the trial. Peptide synthesis was carried out on peptide synthesizer IntavisRSi. To study peptide properties, NAALADase-analysis, molecular docking and determination of IC50 values to LNCaP cell line were carried out.

Results. The IC50 values for binding affinity determination were calculated for each chelator bound to the peptide studied. The IC50 value for peptide conjugation with DOTA chelator is 2.46 nM. When the peptide is bound to the cells of the LNCaP cell line, the IC50 value reaches 36 nM. Molecular docking shows that the peptide interacts with the active center of the molecule of the prostate-specific membrane antigen DockingScore 4,176.

Conclusion. The experiments showed that the peptide “Glu-Val-Pro-Arg-Lei-Ser-Lei-Le-Ala-Val-Fen-Lei” and the DOTA chelator were the most capable of binding to one another. It was demonstrated that the peptide studied was similar to cancer cells of the prostate cancer cell line LNCaP.

Keywords: peptide, prostate gland, radiopharmaceutical, PSSA, PSA.

References

1. Michael M. Shen, Cory Abate-Shen. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 2010; 24 (18): 1967–2000. DOI: 10.1101/gad.1965810.
2. Shuai Gao, Chen-Lin Hsieh, Meenakshi Bhansali, Archana Kannan, Lirim Shemshedini. A Peptide against Soluble Guanylyl Cyclase $\alpha 1$: A New Approach to Treating Prostate Cancer. *PLoS One.* 2013; 8 (5): e64189. DOI: 10.1371/journal.pone.0064189.
3. Jintang He, Xuefei Sun, Tujin Shi, Athena A. Schepmoes, Thomas L. Fillmore, Vladislav A. Petyuk, Fang Xie, Rui Zhao, Marina A. Gritsenko, Feng Yang, Naoki Kitabayashi, Sung-Suk Chae, Mark A. Rubin, Javed Siddiqui, John T. Wei, Arul M. Chinnaiyan, Wei-Jun Qian, Richard D. Smith, Jacob Kagan, Sudhir Srivastava, Karin D. Rodland, Tao Liu, David G. Camp. Antibody-independent targeted quantification of TMPRSS2-ERG fusion protein products in prostate cancer. *Mol. Oncol.* 2014; 8 (7): 1169–1180. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.02.004.
4. Yu-Feng Xiao, Meng-Meng Jie, Bo-Sheng Li, Chang-Jiang Hu, RuiXie, Bo Tang, Shi-Ming Yang. Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015: 761820. DOI: 10.1155/2015/761820.
5. Aaron M. LeBeau, Maya Kostova, Charles S. Craik, Samuel R. Denmeade. Prostate-specific antigen: an overlooked candidate for the targeted treatment and selective imaging of prostate cancer. *Biol. Chem.* 2010; 391 (4): 333–343. DOI: 10.1515/BC.2010.044.
6. Ákos Végvári, Karin Sjödin, Melinda Rezeli, Johan Malm, Hans Lilja, Thomas Laurell, György Marko-Varga. Identification of a Novel Proteoform of Prostate Specific Antigen (SNP-L132I) in Clinical Samples by Multiple Reaction Monitoring. *Mol. Cell Proteomics.* 2013; 12 (10): 2761–2773. DOI: 10.1074/mcp.M113.028365.
7. Aaron M. LeBeau¹, Samuel R. Denmeade. Protease-Activated Pore-Forming Peptides for the Treatment and Imaging of Prostate Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2015; 14 (3): 659–668. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0744.
8. Matej Janeček, Maxim Rossmann, Pooja Sharma, Amy Emery, David J. Huggins, Simon R. Stockwell, Jamie E. Stokes, Yaw S. Tan, Estrella Guarino Almeida, Bryn Hardwick, Ana J. Narvaez, Marko Hyvönen, David R. Spring, Grahame J. McKenzie, Ashok R. Venkitaramana. Allosteric Modulation of AURKA Kinase Activity by a Small-Molecule Inhibitor of Its Protein-Protein Interaction with TPX2. *Scientific Reports.* 2016; 6: 28528. DOI: 10.1038/srep28528.
9. Hui Sun Lee, Yang Zhang. BSP-SLIM: A blind low-resolution ligand-protein docking approach using theoretically predicted protein structures. *Proteins.* 2012; 80: 93–110. DOI: 10.1002/prot.23165.