

УДК 615.277.3

DOI 10.34014/2227-1848-2024-3-126-138

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА ПРЕПАРАТА, НАЦЕЛЕННОГО НА РЕЦЕПТОР БОМБЕЗИНА, ДЛЯ ПЕПТИД-РЕЦЕПТОРНОЙ РАДИОНУКЛИДНОЙ ТЕРАПИИ

Е.А. Белобородов, Е.В. Юрова, Д.Е. Сугак, Е.С. Погодина,  
Е.В. Расторгуева, Ю.В. Саенко

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

Онкозаболевания – одна из основных причин смерти от болезней во всем мире. Перспективным методом терапии онкопатологии является пептид-рецепторная радионуклидная терапия, в которой доставка терапевтического радионуклида осуществляется с помощью пептидных векторов, способных связываться со специфическими рецепторами на поверхности раковых клеток. Одними из характерных для многих типов рака рецепторов, на которые могут быть нацелены пептидные векторы, являются рецепторы бомбезина. Пептиды, обладая рядом преимуществ, имеют один серьезный недостаток – низкую стабильность в среде организма. Вариантом решения данной проблемы является включение терапевтического пептида в структуру высокостабильного пептида кноттина.

*Цель.* Изучить стабильность структуры BBN/C1-C2, созданной на основе кноттина U5-scytotoxin-Sth1a и пептида бомбезина, тропного бомбезиновому рецептору, и ее способность связываться с целевыми рецепторами на поверхности раковых клеток.

*Материалы и методы.* Пептид BBN/C1-C2 был получен методом твердофазного пептидного синтеза, после чего подвергся очистке методом хроматографии под контролем аналитической хроматографии и масс-спектрометрии. Исследование стабильности проводилось методом аналитической хроматографии. Анализ конкурентного ингибирования проводился с помощью пептида GRP, меченного флуоресцентной меткой, при избытке BBN/C1-C2 и флуоресцентно меченого BBN/C1-C2 в присутствии ингибитора рецептора бомбезина GRP. В работе использовались раковая клеточная культура РС-3, экспрессирующая рецепторы бомбезина, и нормальная клеточная культура СНО-К1, не экспрессирующая рецепторы бомбезина.

*Результаты.* Проведенные исследования показали, что гибридный пептид BBN/C1-C2 на основе пептида бомбезина, встроенного в каркас кноттина U5-scytotoxin-Sth1a между первым и вторым остатком цистеина, обладает большей стабильностью по сравнению с коммерческим пептидным препаратом PSMА-617. Пептид BBN/C1-C2 проявляет специфичность в отношении бомбезинового рецептора, связываясь с раковой клеточной культурой РС-3, несущей на своей поверхности целевой рецептор бомбезина, и не связываясь со здоровой клеточной культурой СНО-К1, не несущей на своей поверхности целевого рецептора. Пептид BBN/C1-C2 показывает высокое сродство к рецептору бомбезина, поскольку GRP препятствует его связыванию с клеточной культурой РС-3.

**Ключевые слова:** онкология, пептид, кноттин, рецептор бомбезина.

**Введение.** Рак является одной из основных причин смерти от болезней во всем мире. Согласно оценкам Глобальной онкологической обсерватории (GLOBOCAN) в 2020 г. во всем мире было зарегистрировано около 19,3 млн новых случаев рака и почти 10,0 млн смертей от него. Ожидается, что бремя, связанное с раком, составит 28,4 млн случаев в 2040 г., что на 47 % больше по сравнению с 2020 г. [1].

Долгое время основными методами терапии онкозаболеваний были хирургический,

химио- и радиотерапевтический. Однако данные методы, несмотря на широкое распространение, имеют серьезные недостатки: хирургия малоэффективна при метастазирующих типах рака, радио- и химиотерапия не обладают тканеспецифичностью, что приводит к проявлению токсичности по отношению к здоровым тканям и тяжелым побочным эффектам [2].

Прорывом в лечении онкопатологии стала разработка таргетной терапии, которая позволяет оказывать терапевтическое воздействие

непосредственно на раковые клетки, не затрагивая здоровые [3]. Частным случаем данной методики является пептид-рецепторная радионуклидная терапия, в которой доставка терапевтической нагрузки (радионуклида) осуществляется с помощью пептидных векторов, способных связываться со специфическими рецепторами на поверхности раковых клеток [4].

Самым крупным классом рецепторов, сверхэкспрессирующих на поверхности раковых клеток, являются рецепторы, связанные с G-белком (GPCR). Этот класс включает более 800 рецепторов, имеющих общую структуру из семи трансмембранных спиралей, которые связаны тремя внутри- и внеклеточными петлевыми областями, внеклеточным N-концом и внутриклеточным карбоксил-концевым доменом [5]. К классу GPCR-рецепторов также относят и семейство бомбезиновых рецепторов [6].

Семейство бомбезиновых рецепторов задействовано в самых разнообразных физиологических реакциях, таких как рост тканей, сокращение гладких мышц, пищевое поведение, секреция желез, а также многих эффектах центральной нервной системы, включая регуляцию циркадного ритма [7, 8].

Однако рецепторы бомбезина могут играть важную роль и в развитии онкопатологии [9]. Сверхэкспрессия рецепторов бомбезина обнаруживается при таких заболеваниях, как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак легких, нейробластома и др. [10–13]. Рецепторы бомбезина при их сверхэкспрессии оказывают аутокринное действие на рост опухолевой ткани, а также стимулируют ангиогенез [14, 15].

Особенностью, объединяющей семейство рецепторов бомбезина, является их способность взаимодействовать с пептидом под названием бомбезин [16]. Бомбезин был выделен из кожи лягушки *Bombina bombina* в 1971 г. В. Эрспамером и его коллегами и представляет собой амидированный тетрадекапептид [17]. Именно пептид бомбезин стал основой перспективных пептидных препаратов,

использующихся для лечения опухолей, клетки которых экспрессируют рецепторы бомбезина [6].

Перспективность пептидных препаратов обусловлена преимуществами, которыми обладают пептиды. К таковым относят отсутствие иммуногенности, относительно простой и бюджетный синтез, а также относительно простая модификация [18]. Однако пептиды обладают серьезным ограничением – низкая стабильность как *in vitro*, так и *in vivo*, особенно пептиды подвержены деградации под действием протеаз крови [19].

Решить проблему стабильности пытаются различными способами: применяя ненатуральные аминокислоты, циклизацию, конъюгацию с различными биополимерами [20]. Одним из перспективных направлений повышения стабильности пептидов стало включение терапевтического пептида в каркас более стабильной пептидной молекулы [21].

Мы разработали новую синтетическую пептидную конструкцию на основе высокостабильного пептида кноттина U5-scytotoxin-Sth1a (UniProt: U51A\_SCYTH), выделенного из яда паука *Scytodes thoracica*, в структуру которого был встроен короткий пептид бомбезин (BBN), полученный из кожи лягушки *Bombina bombina*. Пептид бомбезин был встроен между первым и вторым цистеиновым остатком, что дало структуре название BBN/C1-C2.

**Цель исследования.** Изучить стабильность структуры BBN/C1-C2, созданной на основе кноттина U5-scytotoxin-Sth1a и пептида бомбезина, тропного бомбезиновому рецептору, и ее способность связываться с целевыми рецепторами на поверхности раковых клеток.

**Материалы и методы.** Синтез BBN/C1-C2 осуществляли на пептидном синтезаторе ResPep SL (Intavis, Германия) твердофазным методом с использованием Fmoc-защищенных аминокислот (Intavis, Германия) [22].

В качестве специфического ингибитора использовали тропный бомбезиновому рецептору пептид GRP, синтез которого проводился также твердофазным методом [23].

Контроль результатов синтеза осуществлялся методом обращенно-фазовой хроматографии с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии Shimadzu LC-20AD (Shimadzu, Япония) с применением колонки Dr. Maisch Luna C18(2) по стандартному протоколу градиентного элюирования [24]. По протоколу элюирование осуществлялось парой вода (А) и ацетонитрил (Б), где профиль градиента был: 5 минут 95 % А и 5 % Б, затем в течении 40 мин концентрация элюента А увеличивалась с 5 % до 100 %, в конце анализа происходила регенерация колонки 100 % Б в течение 5 мин. Скорость потока составляла 1 мл/мин, детектирование осуществлялось на длине волны 215 нм.

Также для контроля синтеза использовался масс-спектрометрический анализ с применением комплекса MALDI-TOF MS серии FLEX (Bruker Daltonics, Германия).

По результатам синтеза проводилась очистка пептидов методом обращенно-фазовой хроматографии с использованием системы AutoPure25-M604 (Inscinstech) и колонки Galaxil EF-C18H (Galak) по стандартному протоколу градиентного элюирования парой «вода-ацетонитрил» [24]. По протоколу элюирование осуществлялось парой вода (А) и ацетонитрил (Б), где профиль градиента был: 20 мин 95 % А и 5 % Б, затем в течении 80 мин концентрация элюента А увеличивалась с 5 % до 100 %, в конце анализа происходила регенерация колонки 100 % Б в течении 40 мин. Скорость потока составляла 5 мл/мин, детектирование осуществлялось на длине волны 215 нм.

Фолдинг пептида проводили в буфере, содержащем 10 мМ восстановленного глутатиона и 1 мМ окисленного глутатиона в 0,1 М трис-НСl, рН 8,0, при 4 °С при осторожном покачивании в течение 24 ч [25].

В качестве флуоресцентной метки для BBN/C1-C2 использовали FAM(6)-NHS («Люмипроб», Россия), мечение проводили по стандартному протоколу производителя [26].

Стабильность исследуемого пептида BBN/C1-C2 сравнивали с коммерческим препаратом PSMA-617. PSMA-617 является наи-

более современным и перспективным пептидным препаратом, одобренным для таргетной радионуклидной терапии рака предстательной железы, что и обусловило выбор данного препарата для сравнения [27].

Анализ стабильности пептида BBN/C1-C2 и PSMA-617 проводили в физиологическом растворе при 4 °С в течение 96 ч с использованием хроматографической системы Shimadzu LC-20AD XR по принципу обращенно-фазовой хроматографии. Данные обрабатывали в программе Clarity (Clarity Software, Великобритания).

Для анализа прикрепления и интернализации использовали две клеточные культуры: РС-3, экспрессирующую на поверхности бомбезиновый рецептор, и СНО-К1, не экспрессирующую бомбезиновый рецептор [28].

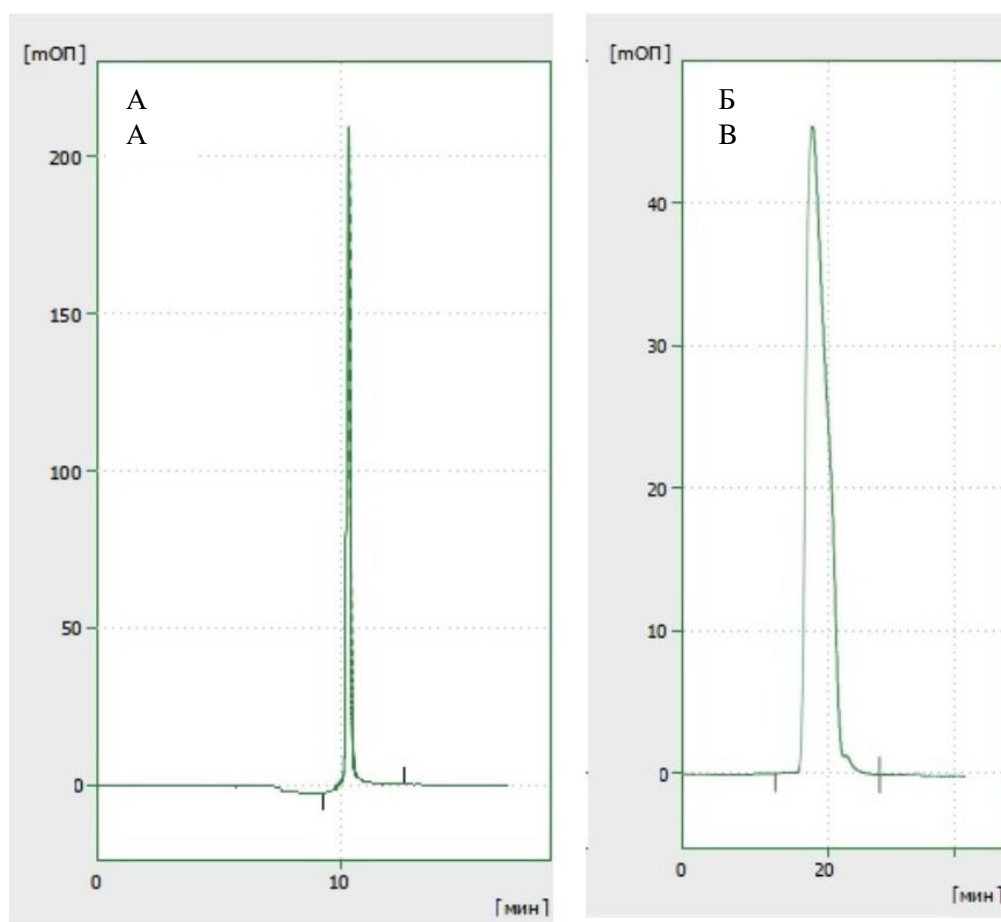
Клетки высевали в 24-луночные планшеты в концентрации 100 000 на лунку в 1 мл среды. Через 24 ч при достижении экспоненциальной стадии роста вместе со свежей питательной средой добавляли BBN/C1-C2 в 1-, 10-, 100-кратном избытке по массе к GRP и культуру инкубировали 30 мин при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> для ингибирования рецептора бомбезина. Затем к культуре добавляли 1 мл среды с GRP и культуру инкубировали 3 ч при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Через 3 ч среду собирали, а клетки трижды промывали холодным фосфатным буфером для удаления несвязавшихся молекул, добавляли 1 мл глицинового буфера (50 мМ в НСl, рН 2,8) и инкубировали в течение 5 мин. Буфер собирали, ячейки промывали холодным фосфатным буфером. Клетки лизировали в 1 мл 0,3 М NaOH в течение 20 мин и собирали лизат [25]. После этого среду убирали, ячейки промывали холодным фосфатным буфером и делали съемку клеток с использованием оптической системы, включающей микроскоп Nikon Ti-S (Nikon, Япония), камеру DS-Qi1MC, объектив Nikon S Plan Fluor ELWD 20×0.45, соответствующие фильтры и ПК с пакетом NIS-elements 4.0. Количественный анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения Image J. Интенсивность флуоресценции вычисляли по формуле: общая флуоресценция клеток = ин-

тегрированная плотность – (площадь выделенной ячейки × средняя флуоресценция фоновых показателей). В качестве контроля фиксировали сигнал флуоресценции без добавления пептидов [29].

Каждый эксперимент проводили в 3 повторях, данные представляли в виде  $M \pm SD$ . Статистическую обработку осуществляли в программе Excel с использованием критерия

Стьюдента, отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В результате синтеза и хроматографической очистки был получен пептид BBN/C1-C2 с химической чистотой более 90 % (рис. 1А). Также был проведен синтез и хроматографическая очистка пептида GRP, выбранного в качестве специфического ингибитора бомбезинового рецептора (рис. 1Б).



**Рис. 1.** Хроматограмма пептида BBN/C1-C2 (А) и GRP (Б)

**Fig. 1.** Chromatogram of BBN/C1-C2 (A) peptide and GRP (B)

В качестве основы для синтетического пептида нами был взят пептид бомбезин, показывающий способность связываться с рецепторами семейства бомбезина, которые экспрессируются на поверхности клеток человека [6]. Такая особенность дает возможность использовать данный пептид как препарат для

пептид-рецепторной радионуклидной терапии опухолей, клетки которых сверхэкспрессируют рецепторы бомбезина. Однако использование нативного бомбезина ограничивает упомянутая ранее низкая стабильность пептидов *in vivo* [30]. Работы, ведущиеся в этом направлении, нацелены на модификацию

нативной последовательности пептида с сохранением его основного свойства [31].

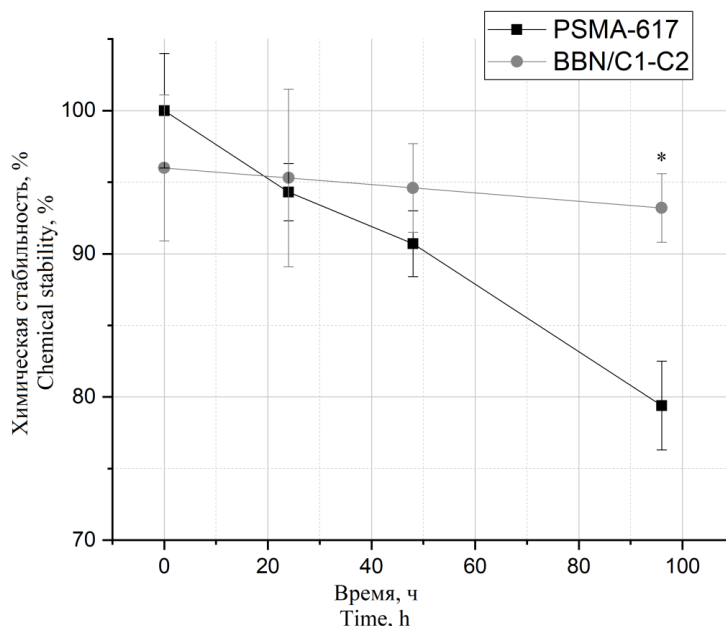
Нами же был использован иной подход к повышению стабильности пептида бомбезина, а именно молекулярная имплантация терапевтического пептида в структуру другого, более стабильного пептида [21]. В качестве такого каркаса был использован пептид кноттин U5-scytotoxin-Sth1a (UniProt: U51A\_SCYTH), выделенный из яда паука-птицеда, не проявляющего токсичность в отношении млекопитающих [32].

Кноттины представляют собой особый класс пептидов, особенностью которых является наличие цистиновых (дисульфидных) связей, образующих узловую структуру. Именно это придает кноттинам высокую стабильность в широком диапазоне pH, температур и иных внешних факторов [32]. Различные работы показывают перспективность применения кноттинов в качестве каркаса для терапевтических пептидов. В одном из последних исследований Лей Цзян и соав. разработали и синтезировали гибридный пептид на основе

агути-родственного пептида, встроенного в каркас кноттина, – ингибитор трипсина *Ecballium elaterium* (EETI-II). Разработанный пептид показал высокую аффинность к рецепторам интегрина и высокоспецифичное поглощение целевой опухолью [33].

Пептид бомбезин был встроен между первым и вторым остатком цистеина, что дало получившейся гибридной молекуле название BBN/C1-C2.

Сравнение BBN/C1-C2 и коммерческого препарата PSMA-617 в среде физиологического раствора при температуре 4°C показало, что синтезированный нами пептид BBN/C1-C2 обладает более высокой стабильностью. Так, BBN/C1-C2 и PSMA-617 в течении первых 24 ч сохраняют высокую стабильность, химическая чистота молекул меняется незначительно: химическая чистота PSMA-617 снижается на 5,7 %, тогда как чистота BBN/C1-C2 снижается всего на 0,7 %. Через 96 ч химическая чистота PSMA-617 снижается с 99,7 % до 79,4 %, в то время как чистота BBN/C1-C2 снижается с 96 % до 93,2 % (рис. 2).



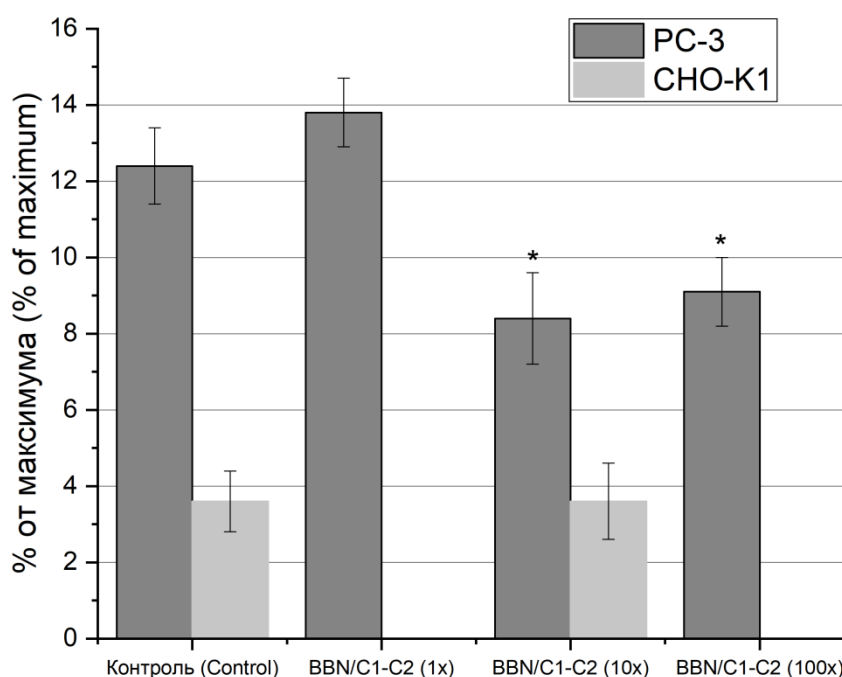
**Рис. 2.** Стабильность пептидов PSMA-617 и BBN/C1-C2 в физиологическом растворе при температуре +4 °C в течении 96 ч (\* – достоверное отличие от PSMA-617)

**Fig. 2.** Stability of PSMA-617 and BBN/C1-C2 peptides in physiological solution, +4°C, 96 hours (\* – the difference is significant compared with PSMA-617)

Было проведено исследование конкурентного ингибирования на клеточной культуре, экспрессирующей бомбезиновый рецептор, при совместной инкубации GRP и BBN/C1-C2.

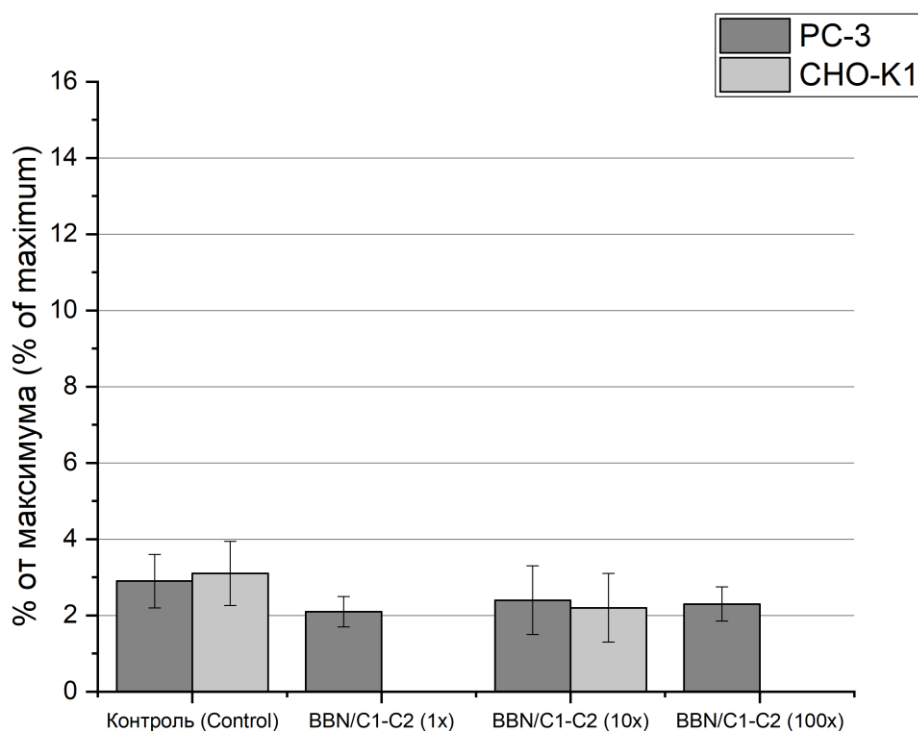
Пептид GRP является аналогом пептида бомбезина, экспрессируется клетками млекопитающих и способен связываться с рецептором GRP, который является членом семейства бомбезиновых рецепторов [34]. Особенностью рецепторов бомбезина также является их минимальная экспрессия на поверхности здоровых клеток млекопитающих (за исключением некоторых органов, например поджелудочной железы) при сверхэкспрессии клетками многих типов рака [35–37].

Для проведения исследования пептиды были помечены флуоресцентной меткой 6-FAM, концентрация BBN/C1-C2 превышала концентрацию GRP в 1, 10 и 100 раз. Результаты исследования показали отсутствие различий GRP и BBN/C1-C2 в соотношении 1:1 в течении 3 ч (рис. 3). При 10-кратном избытке BBN/C1-C2 наблюдалось достоверное снижение сигнала GRP на 30 %. При 100-кратном избытке BBN/C1-C2 не наблюдалось дозозависимого снижения сигнала GRP. Также исследование показало, что избыток BBN/C1-C2 не влияет на интернализацию GRP (рис. 4).



**Рис. 3.** Доля прикрепленного к мембране GRP при избытке BBN/C1-C2 (\* – отличие от контроля)

**Fig. 3.** Proportion of GRP attached to the membrane with excess BBN/C1-C2 (\* – the difference is significant compared with the control)



**Рис. 4.** Доля интернализованного в клетки GRP при избытке BBN/C1-C2 (\* – отличие от контроля)

**Fig. 4.** Proportion of GRP internalized into cells with excess BBN/C1-C2 (\* – the difference is significant compared with the control)

Проведенное исследование показало, что прикрепление и интернализация пептидов GRP и BBN/C1-C2 к клеткам культуры CHO-K1 не превышает значения статистической погрешности (рис. 3 и 4).

**Заключение.** Таким образом, структура, созданная на основе токсина U5-scytotoxin-

Sth1a с помещенным в положение C1-C2 коротким пептидом, тропным к рецептору бомбезина, сохраняет повышенную стабильность без потери способности связываться с целевым рецептором на поверхности клеток и не затрагивает клетки, не экспрессирующие целевой рецептор.

*Данное исследование было профинансировано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 123020700216-4 (FEUF-2023-0004).*

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### **Вклад авторов**

Концепция и дизайн исследования: Белобородов Е.А., Юрова Е.В., Саенко Ю.В.

Литературный поиск, участие в исследовании, обработка материала: Белобородов Е.А., Юрова Е.В., Сугак Д.Е., Погодина Е.С., Расторгуева Е.В.

Статистическая обработка данных: Погодина Е.С.

Анализ и интерпретация данных: Белобородов Е.А., Юрова Е.В., Саенко Ю.В.

Написание и редактирование текста: Белобородов Е.А., Юрова Е.В.

**Литература**

1. *Sung H., Ferlay J., Siegel R.L.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71 (3): 209–249.
2. *Saini K.S., Twelves C.* Determining lines of therapy in patients with solid cancers: a proposed new systematic and comprehensive framework. *Br J Cancer.* 2021; 125 (2): 155–163.
3. *Choi H.Y., Chang J.E.* Targeted Therapy for Cancers: From Ongoing Clinical Trials to FDA-Approved Drugs. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (17): 13618.
4. *Merola E., Grana C.M.* Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT): Innovations and Improvements. *Cancers (Basel).* 2023; 15 (11): 2975.
5. *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.
6. *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.
7. *Moody T.W., Merali Z.* Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides.* 2004; 25 (3): 511–520.
8. *Ramos-Álvarez I., Moreno P., Mantey S.A.* Insights into bombesin receptors and ligands: Highlighting recent advances. *Peptides.* 2015; 72: 128–144.
9. *Gonzalez N., Moody T.W., Igarashi H., Ito T., Jensen R.T.* Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008; 15 (1): 58–64.
10. *Liolios C., Buchmuller B., Bauder-Wüst U.* Monomeric and Dimeric <sup>68</sup>Ga-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.
11. *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.
12. *Judmann B., Braun D., Wängler B., Schirmacher R., Fricker G., Wängler C.* Current State of Radio-labeled Heterobivalent Peptidic Ligands in Tumor Imaging and Therapy. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020; 13 (8): 173.
13. *Faviana P., Boldrini L., Erba P.A.* Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Low Grade Prostate Cancer: Can It Be a Better Predictor Than Prostate-Specific Membrane Antigen? *Front Oncol.* 2021; 11: 650249.
14. *Patel O., Shulkes A., Baldwin G.S.* Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1766 (1): 23–41.
15. *Kanashiro C.A., Schally A.V., Nagy A., Halmos G.* Inhibition of experimental U-118MG glioblastoma by targeted cytotoxic analogs of bombesin and somatostatin is associated with a suppression of angiogenic and antiapoptotic mechanisms. *Int J Oncol.* 2005; 27 (1): 169–174.
16. *Moody T.W., Lee L., Ramos-Alvarez I., Iordanskaia T., Mantey S.A., Jensen R.T.* Bombesin Receptor Family Activation and CNS/Neural Tumors: Review of Evidence Supporting Possible Role for Novel Targeted Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021; 1 (12): 728088.
17. *Lin Y., Chen T., Zhou M., Wang L., Su S., Shaw C.* Ranatensin-HL: A Bombesin-Related Tridecapeptide from the Skin Secretion of the Broad-Folded Frog, *Hylarana latouchii*. *Molecules.* 2017; 22 (7): 1110.
18. *Vadevoo S.M.P., Gurung S., Lee H.S.* Peptides as multifunctional players in cancer therapy. *Exp Mol Med.* 2023; 55 (6): 1099–1109.
19. *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.
20. *Erak M., Bellmann-Sickert K., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G.* Peptide chemistry toolbox - Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorg Med Chem.* 2018; 26 (10): 2759–2765.
21. *Attah F.A., Lawal B.A., Yusuf A.B.* Nutritional and Pharmaceutical Applications of Under-Explored KNOTTIN Peptide-Rich Phytomedicines. *Plants (Basel).* 2022; 11 (23): 3271.
22. *Coin I., Beyermann M., Bienert M.* Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols.* 2007; 2 (12): 3247–3256.
23. *Zhang H., Qi L., Cai Y., Gao X.* Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) as a novel biomarker and therapeutic target in prostate cancer. *Ann Med.* 2024; 56 (1): 2320301.



24. Mant C.T., Chen Y., Yan Z., Popa T.V., Kovacs J.M., Mills J.B., Tripet B.P., Hodges R.S. HPLC analysis and purification of peptides. *Methods Mol Biol.* 2007; 386: 3–55.
25. Moore S.J., Leung C.L., Norton H.K., Cochran J.R. Engineering agatoxin, a cystine-knot peptide from spider venom, as a molecular probe for in vivo tumor imaging. *PLoS One.* 2013; 8 (4): 60498.
26. Lumiprobe.com. URL: <https://ru.lumiprobe.com/protocols/nhs-ester-labeling> (дата обращения: 11.02.2024).
27. Bradley C.A. [177Lu]PSMA-617 radionuclide therapy shows promise. *Nat Rev Urol.* 2018; 15 (8): 468.
28. Ferguson S., Wuest M., Richter S., Bergman C., Dufour J., Krys D., Simone J., Jans H.S., Riauka T., Wuest F. A comparative PET imaging study of 44gSc- and 68Ga-labeled bombesin antagonist BBN2 derivatives in breast and prostate cancer models. *Nucl Med Biol.* 2020; 90-91: 74–83.
29. D'Huyvetter M., Xavier C., Caveliers V., Lahoutte T., Muyltermans S., Devoogdt N. Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014; 11 (12): 1939–1954.
30. Pernot M., Vanderesse R., Frochot C., Guillemain F., Barberi-Heyob M. Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011; 7 (7): 793–802.
31. Li X., Cai H., Wu X., Li L., Wu H., Tian R. New Frontiers in Molecular Imaging Using Peptide-Based Radiopharmaceuticals for Prostate Cancer. *Front Chem.* 2020; 1 (8): 583309.
32. Ariki N.K., Muñoz L.E., Armitage E.L., Goodstein F.R., George K.G., Smith V.L., Vetter I., Herzig V., King G.F., Loening N.M. Characterization of Three Venom Peptides from the Spitting Spider *Scytodes thoracica*. *PLoS One.* 2016; 11 (5): 0156291.
33. Jiang L., Kimura R.H., Miao Z. Evaluation of a (64)Cu-labeled cystine-knot peptide based on agouti-related protein for PET of tumors expressing alphavbeta3 integrin. *J Nucl Med.* 2010; 51 (2): 251–258.
34. Ischia J., Patel O., Bolton D., Shulkes A., Baldwin G.S. Expression and function of gastrin-releasing peptide (GRP) in normal and cancerous urological tissues. *BJU Int.* 2014; 113 (2): 40-47.
35. Chave H.S., Gough A.C., Palmer K., Preston S.R., Primrose J.N. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br J Cancer.* 2000; 82 (1): 124–130.
36. Pooja D., Gunukula A., Gupta N., Adams D.J., Kulhari H. Bombesin receptors as potential targets for anticancer drug delivery and imaging. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019; 114: 105567.
37. Rurarz B.P., Urbanek K.A., Karczmarczyk U., Raczowska J., Habrowska-Górczyńska D.E., Koziel M.J., Kowalska K., Kadlubowski S., Sawicka A., Maurin M., Piastowska-Ciesielska A.W., Ulański P. Towards Cancer Nanoradiopharmaceuticals-Radioisotope Nanocarrier System for Prostate Cancer Theranostics Based on Radiation-Synthesized Polymer Nanogels. *Cancers (Basel).* 2023; 15 (23): 5646.

Поступила в редакцию 20.03.2024; принята 25.06.2024.

#### Авторский коллектив

**Белобородов Евгений Алексеевич** – научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

**Юрова Елена Валерьевна** – младший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

**Сугак Дмитрий Евгеньевич** – младший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

**Погодина Евгения Сергеевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: janeg1411@ya.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8183-5103>.

**Расторгуева Евгения Владимировна** – старший преподаватель кафедры общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии, младший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: rastorgueva.e.v@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1518-4677>.

**Саенко Юрий Владимирович** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: saenko@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

#### Образец цитирования

Белобородов Е.А., Юрова Е.В., Сугак Д.Е., Погодина Е.С., Расторгуева Е.В., Саенко Ю.В. Исследование предшественника препарата, нацеленного на рецептор бомбезина, для пептид-рецепторной радионуклидной терапии. Ульяновский медико-биологический журнал. 2024; 3: 126–138. DOI: 10.34014/2227-1848-2024-3-126-138.

## DRUG PRECURSOR TARGETING THE BOMBESIN RECEPTOR FOR PEPTIDE-RECEPTOR RADIONUCLIDE THERAPY

E.A. Beloborodov, E.V. Yurova, D.E. Sugak, E.S. Pogodina, E.V. Rastorgueva, Yu.V. Saenko

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

*Cancer is a leading cause of death worldwide. A promising modality for cancer treatment is peptide receptor radionuclide therapy. Therapeutic radionuclide is delivered using peptide-based vectors, which can bind to specific receptors on the cancer cell surface. Bombesin receptors are one of the receptors peculiar to many types of cancer, which can be targeted by peptide vectors. Peptides have a number of advantages, but they also have one serious drawback: low stability in the internal environment. To solve the problem, it is possible to include a therapeutic peptide in the structure of a highly stable knottin peptide.*

*Objective. The aim of the study is to examine the stability of BBN/C1-C2 structure, created on the basis of U5-scytotoxinSth1a knottin and bombesin tropic to bombesin receptor, and the ability of this structure to bind to target receptors on the cancer cell surface.*

*Materials and Methods. BBN/C1-C2 peptide was obtained by solid-phase peptide synthesis. Then, it underwent chromatography purification under analytical chromatography and mass spectrometry control. Stability was studied by analytical chromatography. Competitive inhibition analysis was carried out using a fluorescently labeled GRP peptide with excess BBN/C1-C2 and fluorescently labeled BBN/C1-C2 with GRP bombesin receptor inhibitor. Cancer cell line PC-3 expressing bombesin receptors and normal cell line CHO-K1 not expressing bombesin receptors were used in the work.*

*Results. The conducted studies have shown that hybrid BBN/C1-C2 peptide based on bombesin peptide inserted into the U5-scytotoxinSth1a knottin framework between the first and second cysteine residues has a greater stability compared to the commercial radiopharmaceutical PSMA-617. BBN/C1-C2 peptide is specific to bombesin receptor: it binds to PC-3 cancer cell line with a target bombesin receptor on its surface, and does not bind to the healthy CHO-K1 cell line, without a target receptor. BBN/C1-C2 peptide shows high affinity for the bombesin receptor, since GRP prevents its binding to the PC-3 cell line.*

**Key words:** oncology, peptide, knottin, bombesin receptor.

*This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, grant No. 123020700216-4 (FEUF-2023-0004).*

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

#### Author contributions

Research concept and design: Beloborodov E.A., Yurova E.V., Saenko Yu.V.

Literature search, participation in the study, data processing: Beloborodov E.A., Yurova E.V., Sugak D.E., Pogodina E.S., Rastorgueva E.V.

Statistical data processing: Pogodina E.S.

Data analysis and interpretation: Beloborodov E.A., Yurova E.V., Saenko Yu.V.

Text writing and editing: Beloborodov E.A., Yurova E.V.

## References

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71 (3): 209–249.
2. Saini K.S., Twelves C. Determining lines of therapy in patients with solid cancers: a proposed new systematic and comprehensive framework. *Br J Cancer.* 2021; 125 (2): 155–163.
3. Choi H.Y., Chang J.E. Targeted Therapy for Cancers: From Ongoing Clinical Trials to FDA-Approved Drugs. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (17): 13618.
4. Merola E., Grana C.M. Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT): Innovations and Improvements. *Cancers (Basel).* 2023; 15 (11): 2975.
5. 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.
6. 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.
7. Moody T.W., Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides.* 2004; 25 (3): 511–520.
8. Ramos-Álvarez I., Moreno P., Mantey S.A. Insights into bombesin receptors and ligands: Highlighting recent advances. *Peptides.* 2015; 72: 128–144.
9. Gonzalez N., Moody T.W., Igarashi H., Ito T., Jensen R.T. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008; 15 (1): 58–64.
10. Liolios C., Buchmuller B., Bauder-Wüst U. Monomeric and Dimeric <sup>68</sup>Ga-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.
11. 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.
12. Judmann B., Braun D., Wängler B., Schirmmayer R., Fricker G., Wängler C. Current State of Radio-labeled Heterobivalent Peptidic Ligands in Tumor Imaging and Therapy. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020; 13 (8): 173.
13. Faviana P., Boldrini L., Erba P.A. Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Low Grade Prostate Cancer: Can It Be a Better Predictor Than Prostate-Specific Membrane Antigen? *Front Oncol.* 2021; 11: 650249.
14. Patel O., Shulkes A., Baldwin G.S. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1766 (1): 23–41.
15. Kanashiro C.A., Schally A.V., Nagy A., Halmos G. Inhibition of experimental U-118MG glioblastoma by targeted cytotoxic analogs of bombesin and somatostatin is associated with a suppression of angiogenic and antiapoptotic mechanisms. *Int J Oncol.* 2005; 27 (1): 169–174.
16. Moody T.W., Lee L., Ramos-Alvarez I., Iordanskaia T., Mantey S.A., Jensen R.T. Bombesin Receptor Family Activation and CNS/Neural Tumors: Review of Evidence Supporting Possible Role for Novel Targeted Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021; 1 (12): 728088.
17. Lin Y., Chen T., Zhou M., Wang L., Su S., Shaw C. Ranatensin-HL: A Bombesin-Related Tridecapeptide from the Skin Secretion of the Broad-Folded Frog, *Hylarana latouchii*. *Molecules.* 2017; 22 (7): 1110.
18. Vadevoo S.M.P., Gurung S., Lee H.S. Peptides as multifunctional players in cancer therapy. *Exp Mol Med.* 2023; 55 (6): 1099–1109.
19. 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.
20. Erak M., Bellmann-Sickert K., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. Peptide chemistry toolbox - Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorg Med Chem.* 2018; 26 (10): 2759–2765.
21. Attah F.A., Lawal B.A., Yusuf A.B. Nutritional and Pharmaceutical Applications of Under-Explored Knottin Peptide-Rich Phytomedicines. *Plants (Basel).* 2022; 11 (23): 3271.
22. Coin I., Beyermann M., Bienert M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols.* 2007; 2 (12): 3247–3256.
23. Zhang H., Qi L., Cai Y., Gao X. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) as a novel biomarker and therapeutic target in prostate cancer. *Ann Med.* 2024; 56 (1): 2320301.

24. Mant C.T., Chen Y., Yan Z., Popa T.V., Kovacs J.M., Mills J.B., Triplet B.P., Hodges R.S. HPLC analysis and purification of peptides. *Methods Mol Biol.* 2007; 386: 3–55.
25. Moore S.J., Leung C.L., Norton H.K., Cochran J.R. Engineering agatoxin, a cystine-knot peptide from spider venom, as a molecular probe for in vivo tumor imaging. *PLoS One.* 2013; 8 (4): 60498.
26. *Lumiprobe.com*. Available at: <https://ru.lumiprobe.com/protocols/nhs-ester-labeling> (accessed: February 11, 2024).
27. Bradley C.A. [177Lu]PSMA-617 radionuclide therapy shows promise. *Nat Rev Urol.* 2018; 15 (8): 468.
28. Ferguson S., Wuest M., Richter S., Bergman C., Dufour J., Krys D., Simone J., Jans H.S., Riauka T., Wuest F. A comparative PET imaging study of 44gSc- and 68Ga-labeled bombesin antagonist BBN2 derivatives in breast and prostate cancer models. *Nucl Med Biol.* 2020; 90-91: 74–83.
29. D'Huyvetter M., Xavier C., Caveliers V., Lahoutte T., Muyltermans S., Devoogdt N. Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014; 11 (12): 1939–1954.
30. Pernot M., Vanderesse R., Frochot C., Guillemain F., Barberi-Heyob M. Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011; 7 (7): 793–802.
31. Li X., Cai H., Wu X., Li L., Wu H., Tian R. New Frontiers in Molecular Imaging Using Peptide-Based Radiopharmaceuticals for Prostate Cancer. *Front Chem.* 2020; 1 (8): 583309.
32. Ariki N.K., Muñoz L.E., Armitage E.L., Goodstein F.R., George K.G., Smith V.L., Vetter I., Herzig V., King G.F., Loening N.M. Characterization of Three Venom Peptides from the Spitting Spider *Scytodes thoracica*. *PLoS One.* 2016; 11 (5): 0156291.
33. Jiang L., Kimura R.H., Miao Z. Evaluation of a (64)Cu-labeled cystine-knot peptide based on agouti-related protein for PET of tumors expressing alphavbeta3 integrin. *J Nucl Med.* 2010; 51 (2): 251–258.
34. Ischia J., Patel O., Bolton D., Shulkes A., Baldwin G.S. Expression and function of gastrin-releasing peptide (GRP) in normal and cancerous urological tissues. *BJU Int.* 2014; 113 (2): 40–47.
35. Chave H.S., Gough A.C., Palmer K., Preston S.R., Primrose J.N. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br J Cancer.* 2000; 82 (1): 124–130.
36. Pooja D., Gunukula A., Gupta N., Adams D.J., Kulhari H. Bombesin receptors as potential targets for anticancer drug delivery and imaging. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019; 114: 105567.
37. Rurarz B.P., Urbanek K.A., Karczmarczyk U., Raczkowska J., Habrowska-Górczyńska D.E., Kozieł M.J., Kowalska K., Kadłubowski S., Sawicka A., Maurin M., Piastowska-Ciesielska A.W., Ulański P. Towards Cancer Nanoradiopharmaceuticals-Radioisotope Nanocarrier System for Prostate Cancer Theranostics Based on Radiation-Synthesized Polymer Nanogels. *Cancers (Basel).* 2023; 15 (23): 5646.

Received March 20, 2024; accepted June 25, 2024.

### Information about the authors

**Beloborodov Evgeniy Alekseevich**, Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: beloborodov.evgeniy.a@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5666-5154>.

**Yurova Elena Valer'evna**, Junior Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: urovaev523@gmail.com, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7484-2671>.

**Sugak Dmitriy Evgen'evich**, Junior Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: dmitriysugak@mail.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3276-8976>.

**Pogodina Evgeniya Sergeevna**, Candidate of Sciences (Biology), Senior Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: janeg1411@ya.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8183-5103>.

**Rastorgueva Evgeniya Vladimirovna**, Senior Lecturer, Chair of General and Clinical Pharmacology with a Course in Microbiology, Junior Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St. 42; e-mail: rastorgueva.e.v@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1518-4677>.

**Saenko Yuriy Vladimirovich**, Doctor of Sciences (Biology), Leading Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St. 42; e-mail: saenkoyv@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

**For citation**

Beloborodov E.A., Yurova E.V., Sugak D.E., Pogodina E.S., Rastorgueva E.V., Saenko Yu.V. Issledovanie predshestvennika preparata, natselnogo na retseptor bombezina, dlya peptid-retseptornoy radionuklidnoy terapii [Drug precursor targeting the bombesin receptor for peptide-receptor radionuclide therapy]. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskiy zhurnal*. 2024; 3: 126–138. DOI: 10.34014/2227-1848-2024-3-126-138 (in Russian).