

УДК 615.849

DOI 10.34014/2227-1848-2024-1-162-171

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА РАДИОФАРМПРЕПАРАТА, НАЦЕЛЕННОГО НА ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ МЕМБРАННЫЙ АНТИГЕН

Е.А. Белобородов, Е.В. Юрова, Е.Д. Сугак, Е.В. Расторгуева,  
А.Н. Фомин, Ю.В. Саенко

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

*Рак предстательной железы – одно из наиболее часто диагностируемых онкологических заболеваний во всем мире. Одной из стратегий лечения является таргетная терапия с использованием коротких пептидов, нацеленных на простат-специфический мембранный антиген (ПСМА). Однако короткие пептиды обладают рядом недостатков, к которым относится низкая стабильность in vivo. Решить данную проблему можно с использованием токсинов с ингибиторным цистинным узлом, в структуру которого встраивается короткий пептид.*

*Цель исследования. Изучить стабильность и способность пептида PSMA/C1-C2, созданного на основе кноттина U5-scytotoxin-Sth1a и короткого пептида, тропного к ПСМА, связываться с рецепторами на поверхности клеток рака предстательной железы в сравнении с коммерческим препаратом PSMA I&T и специфическим ингибитором ПСМА.*

*Материалы и методы. Синтез пептида осуществлялся с использованием твердофазного пептидного синтезатора, анализ и очистка – методами хроматографии и масс-спектрометрии. Анализ конкурентного ингибирования проводился с использованием радиоактивно меченного коммерческого PSMA I&T при избытке PSMA/C1-C2 и FAM-меченного PSMA/C1-C2 в присутствии специфического ингибитора ПСМА 2-PMPA. В качестве клеточных культур использовались ПСМА-положительная культура 22Rv1 и ПСМА-отрицательная культура РС-3. Стабильность пептидов оценивалась с использованием хроматографии.*

*Результаты. В результате экспериментов были получены данные, указывающие на то, что синтезированная структура PSMA/C1-C2, созданная на основе кноттина и короткого пептида, препятствует связыванию PSMA I&T с рецепторами на поверхности клеток 22Rv1. Снижение связывания PSMA/C1-C2 в присутствии 2-PMPA свидетельствует о том, что PSMA/C1-C2 нацелен на простат-специфический мембранный антиген. Кроме того, пептид PSMA/C1-C2 обладает повышенной стабильностью по сравнению с PSMA I&T.*

**Ключевые слова:** простат-специфический мембранный антиген, таргетная терапия, пептид, кноттин.

**Введение.** Рак предстательной железы является одним из наиболее часто диагностируемых онкологических заболеваний во всем мире. Существует несколько основных методов лечения данного заболевания. При первом появлении используются лучевые и хирургические процедуры. Несмотря на значительное увеличение продолжительности жизни после первой хирургической или лучевой терапии, болезнь рецидивирует более чем у 30 % пациентов [1]. Андрогенная депривация чаще всего является альтернативной стратегией лечения рака предстательной железы, поскольку

для прогрессирования опухоли необходимы мужские гормоны. Однако, несмотря на отличный первоначальный ответ, у большинства пациентов в течение 2–3 лет возникает рецидив [2]. Химиотерапевтические препараты, такие как доцетаксел, доксорубин, обеспечивают несколько месяцев выживаемости без прогрессирования, но с высокотоксичными эффектами [3, 4].

Для преодоления ограничений современных методов лечения необходимо разработать такую стратегию лечения, которая позволит избирательно воздействовать на раковые

клетки и избегать неблагоприятного влияния на нормальные ткани. Одной из таких стратегий является таргетная терапия с использованием коротких пептидов, нацеленных на специфические рецепторы. Подобные пептиды, меченные радиоизотопами, способны избирательно прикрепляться к рецепторам на поверхности раковых клеток, в т.ч. простат-специфическому мембранному антигену (ПСМА), который в значительной степени экспрессируется на поверхности клеток рака простаты, тем самым оказывая терапевтическое воздействие. К основным преимуществам такого подхода относятся высокая специфичность и сниженная токсичность [5]. Однако здесь также имеется ряд нюансов, в частности низкая стабильность терапевтической молекулы *in vivo*, что, соответственно, снижает биодоступность [6]. Решить данную проблему можно с использованием пептидов с ингибиторным цистиновым узлом. К данной группе в первую очередь относятся токсины членистоногих, обладающие природной термической и протеолитической стабильностью [7].

В нашей работе мы использовали токсин U5-scytotoxin-Sth1a (UniProt: U51A\_SCYTH) паука *Scytodes thoracica* в качестве стабилизирующей молекулы для короткого пептида, тропного к простат-специфическому мембранному антигену. На этой основе был создан пептид PSMA/C1-C2, поскольку короткий пептид помещался между первым и вторым остатками цистеина.

**Цель исследования.** Изучить стабильность и способность пептида PSMA/C1-C2, созданного на основе кноттина U5-scytotoxin-Sth1a и короткого пептида, тропного к простат-специфическому мембранному антигену, связываться с рецепторами на поверхности клеток рака предстательной железы в сравнении с коммерческим препаратом PSMA I&T и специфическим ингибитором.

#### **Материалы и методы.**

Синтез PSMA/C1-C2 осуществляли на пептидном синтезаторе ResPep SL (Intavis, Германия) с использованием Fmoc-защищенных аминокислот (Intavis, Германия). Очистку пептида проводили с использованием хроматографической системы NGC Quest™ 10 (Bio-

Rad, США) и сорбента Bio-Gel P-4 на колонке Econo-Column 1×30 cm (Bio-Rad, США). Контроль качества осуществляли с помощью хроматографа Shimadzu LC-20AD XR (Shimadzu, Япония), оснащенного спектрофотометрическим детектором SPD-20A, по принципу обращенно-фазовой хроматографии. Анализ радиохимической чистоты производили на хроматографе Shimadzu (Shimadzu, Япония) с детектором GABI (Elysia-Raytest, Германия). Масс-спектрометрический анализ проводили на основе масс-спектрометрии MALDI-TOF на MALDI-TOF MS серии FLEX (Bruker Daltonics, Германия). Фолдинг пептида проводили в буфере, содержащем 10 мМ восстановленного глутатиона и 1 мМ окисленного глутатиона в 0,1 М трис-HCl, pH 8,0, при 4 °C при осторожном покачивании в течение 24 ч [8].

Предшественник PSMA I&T, а также PSMA I&T, меченный лютецием-177, были получены от АО «НИФХИ» им. Я.Л. Карпова. В качестве специфического ингибитора ПСМА использовали 2-PMPA (MedChemExpress, США). В качестве флуоресцентной метки для PSMA/C1-C2 использовали FAM(6)-NHS («Люмипроб», Россия), мечение проводили по стандартному протоколу производителя [9].

В качестве питательной среды для клеточных культур применяли RPMI-1640 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Biowest, Франция), витаминов для RPMI-1640, пирувата натрия и пенициллина/стрептомицина. Все компоненты – от «Панэко» (Россия), если не указано иное. Клеточные культуры инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>.

Анализ стабильности пептида PSMA/C1-C2 и предшественника PSMA I&T проводили в физиологическом растворе при 4 °C 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: 22Rv1, экспрессирующую на поверхности ПСМА рецепторы, и PC-3, не экспрессирующую ПСМА [10, 11].

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 PSMA/C1-C2 в 1-, 10-, 100-кратном избытке по массе к PSMA I&T и культуру инкубировали 30 мин при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> для ингибирования ПСМА. Затем к культуре добавляли 1 мл среды с Lu-PSMA I&T с активностью 2МБк и культуру инкубировали 3 ч при 37 °C 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 HCl, pH 2,8) и инкубировали в течение 5 мин. Буфер собирали, ячейки промывали холодным фосфатным буфером. Наконец, клетки лизировали в 1 мл 0,3 М NaOH в течение 20 мин и собирали лизат [12]. После этого активность в среде, глициновом буфере и клеточном лизате измеряли с использованием гамма-счетчика ISOMED 2010 (PTW, Германия).

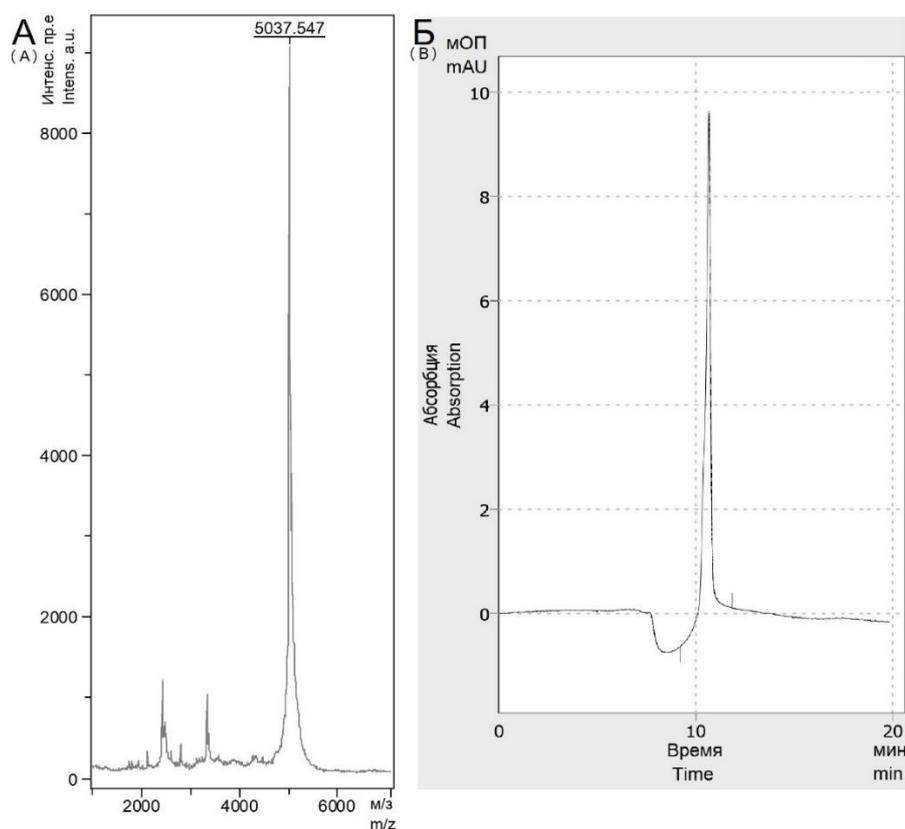
Для анализа конкурентного ингибирования использовали 2-РМРА. Клетки высевали в 24-луночный планшет в концентрации 100 000 на лунку и оставляли на 24 ч. После этого к культуре добавляли свежую среду, содержащую 500 мкМ 2-РМРА, и инкубировали 30 мин. Затем среду меняли на свежую с добавлением 1 мкМ FAM-PSMA/C1-C2 и инкубировали еще 3 ч. 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 = интегрированная плотность – (площадь выделенной ячейки × средняя флуоресценция фоновых показателей). В качестве контроля фиксировали сигнал флуоресценции без добавления пептидов [13].

Каждый эксперимент проводили в трех повторях, данные представляли в виде  $M \pm SD$ . Статистическую обработку данных осуществляли в программе Excel с использованием критерия Стьюдента, отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

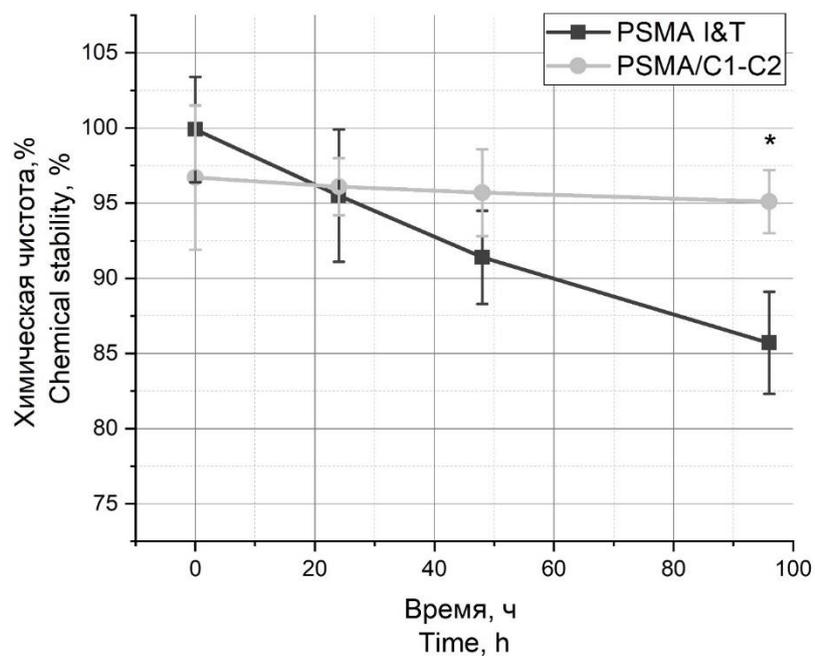
**Результаты.** В результате твердофазного синтеза был получен пептид PSMA/C1-C2 с чистотой более 90 % (рис. 1Б). Поскольку в основе молекулярной структуры лежит токсин, который формирует три дисульфидных мостика, то в результате фолдинга масса молекулы уменьшилась на 6 дальтон (рис. 1А).

При анализе стабильности структур в физиологическом растворе при 4° C было выявлено, что и PSMA I&T, и PSMA/C1-C2 сохраняют повышенную стабильность в течение первых 24 ч, однако химическая чистота PSMA I&T снижается на 4,4 %, в то время как чистота PSMA/C1-C2 – только на 0,6 %. В итоге через 96 ч PSMA I&T разрушается с 99,9 % до 85,7 %, а химическая чистота PSMA/C1-C2 снижается с 96,7 % до 95,1 % (рис. 2).



**Рис. 1.** Масс-спектрограмма (А) и хроматограмма (Б) пептида PSMA/C1-C2

**Fig. 1.** Mass spectrogram (A) and chromatogram (B) of the PSMA/C1-C2 peptide

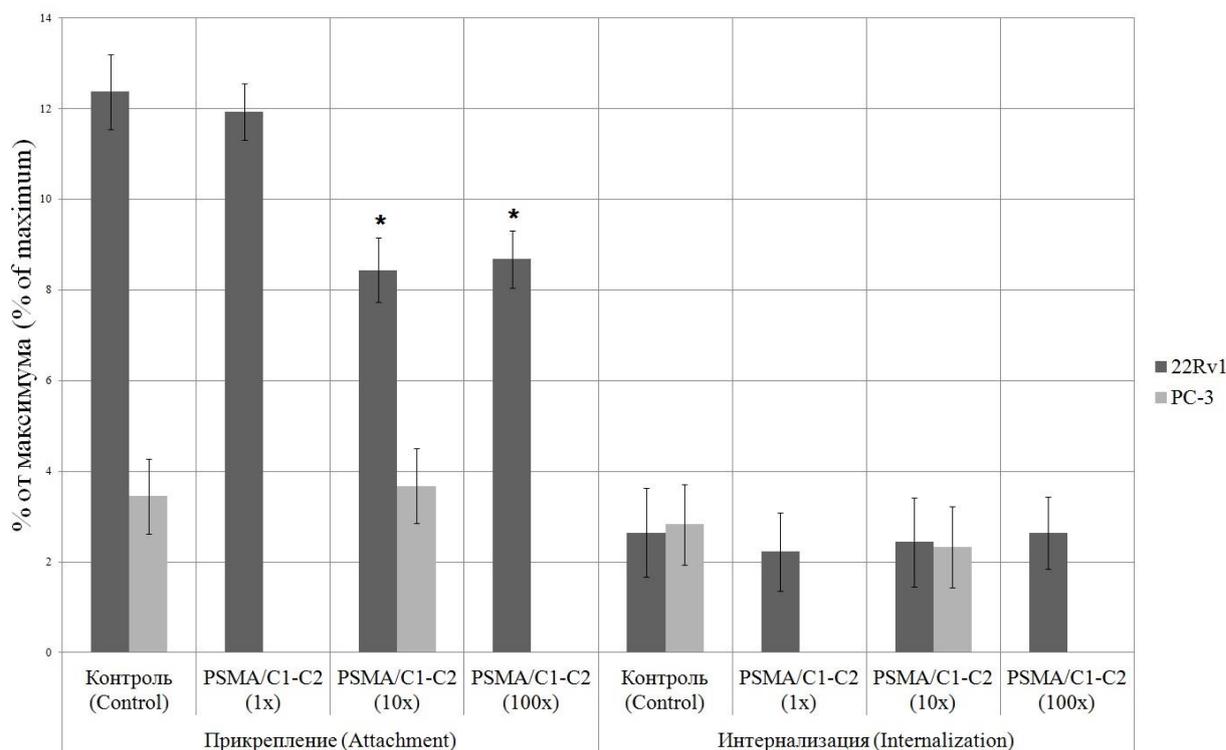


**Рис. 2.** Стабильность пептидов PSMA I&T и PSMA/C1-C2 в физиологическом растворе при температуре 4 °С в течение 96 ч (\* – достоверное отличие от группы PSMA I&T)

**Fig. 2.** Stability of PSMA I&T and PSMA/C1-C2 peptides in saline solution at 4 °C for 96 hours (\* – the difference is significant compared with the PSMA I&T group)

Анализ конкурентного ингибирования на ПСМА-положительной культуре 22RV1 при совместной инкубации PSMA I&T, меченного изотопом лютеция-177, и PSMA/C1-C2 в концентрациях, превышающих PSMA I&T в 1, 10 и 100 раз, показал отсутствие различий в прикреплении PSMA I&T при соотношении PSMA I&T и PSMA/C1-C2 1:1 в течение трех часов (рис. 3). При избытке PSMA/C1-C2 в 10 раз наблюдалось достоверное снижение

сигнала PSMA I&T, количество зафиксированной активности снижалось почти на 30 %. Однако последующее увеличение концентрации PSMA/C1-C2 до 100-кратного избытка не вызывало дальнейшего дозозависимого снижения сигнала. При анализе влияния избытка PSMA/C1-C2 на интернализацию PSMA I&T было выявлено, что PSMA I&T незначительно проникает в клетки, независимо от наличия PSMA/C1-C2.



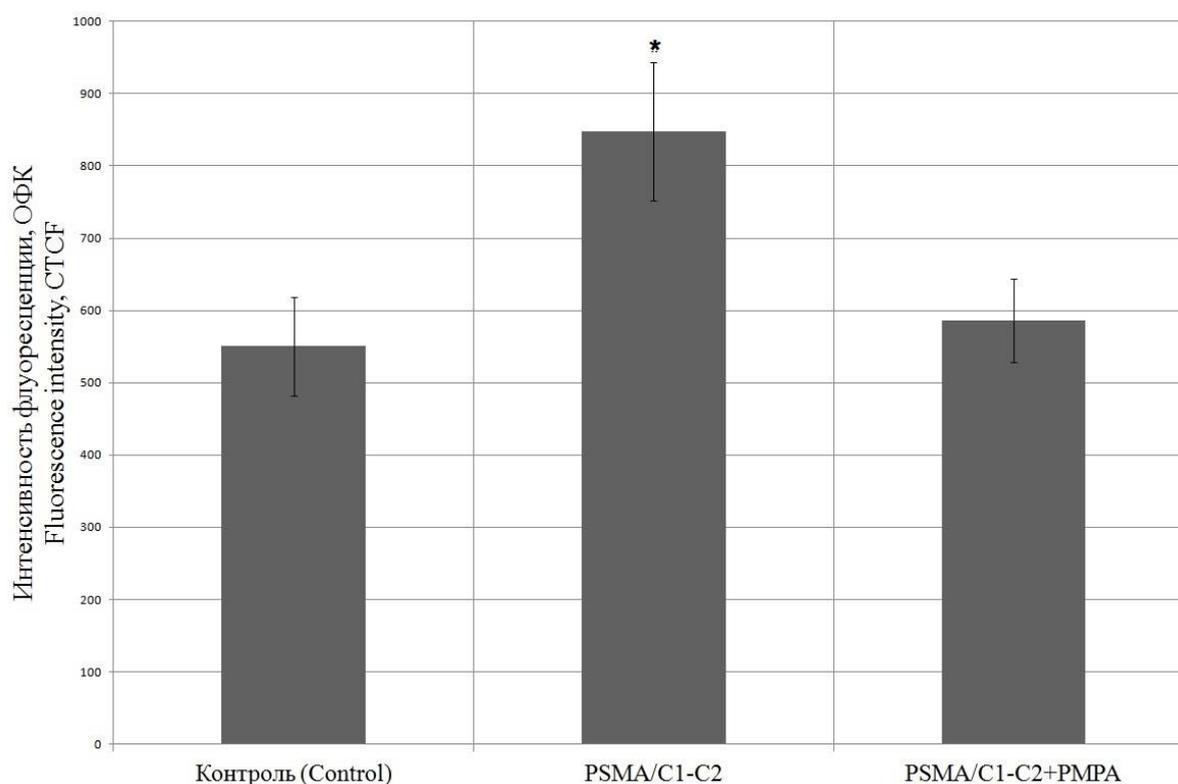
**Рис. 3.** Доля прикрепленного к мембранам и интернализованного в клетки PSMA I&T при избытке PSMA/C1-C2 (\* – отличие от контроля)

**Fig. 3.** Proportion of PSMA I&T attached to membranes and internalized into cells with an excess of PSMA/C1-C2 (\* – difference from control)

Дополнительно фиксировалась степень прикрепления и интернализации на ПСМА-отрицательной культуре PC-3. На рис. 3 видно, что PSMA I&T незначительно крепится к мембране клеток PC-3 и в слабой мере проникает внутрь, независимо от наличия в среде для культивации PSMA/C1-C2.

Аналогичным методом конкурентного ингибирования анализировалось связывание FAM-меченного PSMA/C1-C2 с рецепторами

на поверхности раковых клеток 22Rv1 в присутствии в питательной среде специфического ингибитора ПСМА 2-PMPA. Видно, что пептид PSMA/C1-C2 крепится к мембране ПСМА-положительных клеток 22Rv1 (рис. 4), однако при совместной инкубации с 2-PMPA сигнал флуоресценции статистически неотличим от контроля, что говорит о конкурентном связывании PSMA/C1-C2 и 2-PMPA с ПСМА.



**Рис. 4.** Степень прикрепления PSMA/C1-C2 при наличии и отсутствии специфического ингибитора ПСМА (ОФК – общая флуоресценция клеток; \* – отличие от контроля)

**Fig. 4.** Degree of PSMA/C1-C2 attachment with and without a specific PSMA inhibitor (CTCF – Corrected Total Cell Fluorescence; \* – difference from control)

**Обсуждение.** В настоящее время для лечения рака предстательной железы в рамках таргетной терапии находятся в разработке или используются ряд пептидных препаратов. Одним из наиболее распространенных агентов является PSMA-11, который принадлежит к классу пептидомиметических ингибиторов ПСМА и к классу ингибиторов ПСМА на основе мотива глутамат-мочевин-лизин, о которых впервые сообщалось в 2001 г. PSMA-11 был одобрен в 2020 г. как первый радиофармацевтический препарат, меченный Ga68, для ПЭТ-визуализации ПСМА-положительных пациентов с раком предстательной железы [14]. Последним ПСМА-тропным препаратом, получившим регистрационное удостоверение в 2022 г., стал PSMA-617 (Pluvicto). Препарат был также разработан на основе мотива глутамат-мочевин-лизин. Отличием данного препарата стало самое низкое в сравнении с пред-

шественниками накопление в фоновых органах и высокое накопление в опухолевой ткани [15]. Еще одним распространенным в настоящее время радиофармпрепаратом, нацеленным на ПСМА, является PSMA I&T – аналог PSMA-617 с рядом модификаций [16].

В данной работе мы взяли PSMA I&T, меченный радиоизотопом лютеция-177, в качестве молекулы для сравнения с разработанным нами PSMA/C1-C2. Существенным отличием PSMA/C1-C2 от аналогов является его стабилизация за счет включения в качестве одного из доменов в молекулу токсина U5-scytotoxin-Sth1a. Так, химическая чистота PSMA I&T за 96 ч в физрастворе при 4 °C снижается на 14,2 %, в то время как чистота PSMA/C1-C2 – только на 1,6 %. Однако, несмотря на повышенную стабильность, важным моментом при анализе таргетных препаратов является их способность связываться с

целевыми рецепторами на поверхности раковых клеток. Мы смогли оценить степень связывания структуры PSMA/C1-C2 через конкурентное ингибирование: в первом случае – с использованием радиоактивно меченного PSMA I&T при многократном избытке PSMA/C1-C2, который выступает в качестве ингибитора ПСМА (рис. 3), во втором случае – с использованием специфического ингибитора ПСМА 2-РМРА, который препятствует прикреплению PSMA/C1-C2 (рис. 4). В обоих случаях были получены данные о том, что PSMA/C1-C2 сохраняет способность связываться с ПСМА на поверхности клеток несмотря на то, что структура дополнительно модифицируется. При этом исключается ин-

тернализация пептида в клетку и прикрепление к поверхности клеток, не экспрессирующих ПСМА. Отдельно стоит отметить, что PSMA/C1-C2 препятствует прикреплению PSMA I&T при 10-кратном избытке, однако увеличение кратности избытка не ведет к усилению эффекта.

**Заключение.** Таким образом, структура, созданная на основе токсина U5-scytotoxin-Sth1a с помещенным в положение C1-C2 коротким пептидом, тропным к ПСМА, сохраняет повышенную стабильность без потери способности связываться с целевым рецептором на поверхности клеток и не затрагивает клетки, не экспрессирующие ПСМА.

*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.

#### **Вклад авторов**

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

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

Статистическая обработка данных: Расторгуева Е.В.

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. Azab S., Zakaria M., Raafat M., Seief H. The combination of urinary IL-6 and renal biometry as useful diagnostic tools to differentiate acute pyelonephritis from lower urinary tract infection. *Int Braz J Urol.* 2016; 42 (4): 810–816.
2. Perlmutter M.A., Lepor H. Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *Rev Urol.* 2007; 9 (1): 3–8.
3. Rebello R.J., Oing C., Knudsen K.E., Loeb S., Johnson D.C., Reiter R.E., Gillessen S., Van der Kwast T., Bristow R.G. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2021; 7 (1): 9.
4. Beer T.M., Bubalo J.S. Complications of chemotherapy for prostate cancer. *Semin Urol Oncol.* 2001; 19 (3): 222–230.
5. Nhàn N.T.T., Yamada T., Yamada K.H. Peptide-Based Agents for Cancer Treatment: Current Applications and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (16): 12931.
6. Pernot M., Vanderesse R., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M. Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2011; 7 (7): 793–802.
7. Kolmar H. Natural and engineered cystine knot miniproteins for diagnostic and therapeutic applications. *Curr Pharm Des.* 2011; 17 (38): 4329–4336.
8. 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.
9. Lumiprobe RUS Ltd, Labeling of biomolecules with activated esters. Lumiprobe.com. URL: <https://ru.lumiprobe.com/protocols/nhs-ester-labeling> (дата обращения: 12.07.2023).

10. Gorges T.M., Riethdorf S., von Ahsen O., Nastal Y.P., Röck K., Boede M., Peine S., Kuske A., Schmid E., Kneip C., König F., Rudolph M., Pantel K. Heterogeneous PSMA expression on circulating tumor cells: a potential basis for stratification and monitoring of PSMA-directed therapies in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016; 7 (23): 34930–34941.
11. Xia L., Wen L., Meng X., Zhou N., Guo X., Liu T., Xu X., Wang F., Zhu H., Yang Z. Application Analysis of 124I-PPMN for Enhanced Retention in Tumors of Prostate Cancer Xenograft Mice. *Int J Nanomedicine*. 2021; 16: 7685–7695.
12. Dos Santos J.C., Schäfer M., Bauder-Wüst U., Beijer B., Eder M., Leotta K., Kleist C., Meyer J.P., Dilling T.R., Lewis J.S., Kratochwil C., Kopka K., Haberkorn U., Mier W. Refined Chelator Spacer Moieties Ameliorate the Pharmacokinetics of PSMA-617. *Front Chem*. 2022; 10: 898692.
13. Khokhlova A., Zolotovskii I., Pogodina E., Saenko Y., Stoliarov D., Vorsina S., Fotiadi A., Liamina D., Sokolovski S., Rafailov E. Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. *Proceedings of the SPIE*. 2019; 10861.
14. Hennrich U., Eder M. [68Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021; 14 (8): 713.
15. Hennrich U., Eder M. [177Lu]Lu-PSMA-617 (Pluvicto™): The First FDA-Approved Radiotherapeutic for Treatment of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022; 15 (10): 1292.
16. Karimzadeh A., Heck M., Tauber R., Knorr K., Haller B., D'Alessandria C., Weber W.A., Eiber M., Rauscher I. 177Lu-PSMA-I&T for Treatment of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Prognostic Value of Scintigraphic and Clinical Biomarkers. *J Nucl Med*. 2023; 64 (3): 402–409.

Поступила в редакцию 06.10.2023; принята 11.01.2024.

#### 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>.

**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>.

**Фомин Александр Николаевич** – кандидат технических наук, старший научный сотрудник НИТИ им. С.П. Капицы, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет». 432017, Россия, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: mr.fominan@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0826-1857>.

**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: saenkojuv@yandex.ru, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4402-1482>.

#### Образец цитирования

Белобородов Е.А., Юрова Е.В., Сугак Е.Д., Расторгуева Е.В., Фомин А.Н., Саенко Ю.В. Исследование предшественника радиофармпрепарата, нацеленного на простат-специфический мембранный антиген. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2024; 1: 162–171. DOI: 10.34014/2227-1848-2024-1-162-171.

## STUDY OF A RADIOPHARMACEUTICAL PRECURSOR TARGETING PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN

E.A. Beloborodov, E.V. Yurova, E.D. Sugak, E.V. Rastorgueva, A.N. Fomin, Yu.V. Saenko

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

*Prostate cancer is one of the most commonly diagnosed cancers worldwide. Targeted therapy is an anti-cancer strategy using short peptides targeting prostate-specific membrane antigen (PSMA). However, short peptides have a number of disadvantages, including low stability in vivo. This problem can be solved by using toxins with an inhibitory cystine knot with a short built in peptide.*

*The aim of the study is to examine the stability and ability of the PSMA/C1-C2 peptide, created on the base of knottin U5-scytotoxin-Sth1a and a short peptide tropic to PSMA, to bind to receptors on the surface of prostate cancer cells and to compare the results with a market image drug PSMA I&T and a specific PSMA inhibitor.*

*Materials and Methods. A solid-phase peptide synthesizer was used for peptide synthesis, chromatography and mass spectrometry were applied for analysis and purification. A competitive inhibition analysis was performed with radiolabeled commercial PSMA I&T in excess of PSMA/C1-C2 and FAM-labeled PSMA/C1-C2 with a specific PSMA inhibitor 2-PMPA. PSMA-positive culture 22Rv1 and PSMA-negative culture PC-3 were used as cell cultures. Chromatography was used to assess peptide stability.*

*Results. As a result, it was observed that the synthesized PSMA/C1-C2 structure, created on the basis of knottin and a short peptide, prevents binding of PSMA I&T to receptors on the surface of 22Rv1 cells. The decrease in PSMA/C1-C2 binding in the presence of 2-PMPA suggests that PSMA/C1-C2 is targeted for prostate-specific membrane antigen. In addition, PSMA/C1-C2 peptide has increased stability compared to PSMA I&T.*

**Key words:** prostate-specific membrane antigen, targeted therapy, peptide, knottin.

*The work was carried out with the financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. 123020700216 (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., Fomin A.N., Saenko Yu.V.

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

Statistical data processing: Rastorgueva E.V.

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. Azab S., Zakaria M., Raafat M., Seief H. The combination of urinary IL-6 and renal biometry as useful diagnostic tools to differentiate acute pyelonephritis from lower urinary tract infection. *Int Braz J Urol.* 2016; 42 (4): 810–816.
2. Perlmutter M.A., Lepor H. Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *Rev Urol.* 2007; 9 (1): 3–8.
3. Rebello R.J., Oing C., Knudsen K.E., Loeb S., Johnson D.C., Reiter R.E., Gillissen S., Van der Kwast T., Bristow R.G. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2021; 7 (1): 9.
4. Beer T.M., Bubalo J.S. Complications of chemotherapy for prostate cancer. *Semin Urol Oncol.* 2001; 19 (3): 222–230.
5. Nhan N.T.T., Yamada T., Yamada K.H. Peptide-Based Agents for Cancer Treatment: Current Applications and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (16): 12931.
6. Pernot M., Vanderesse R., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M. Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2011; 7 (7): 793–802.
7. Kolmar H. Natural and engineered cystine knot miniproteins for diagnostic and therapeutic applications. *Curr Pharm Des.* 2011; 17 (38): 4329–4336.

8. 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.
9. Lumiprobe RUS Ltd, Labeling of biomolecules with activated esters. *Lumiprobe.com*. Available at: <https://ru.lumiprobe.com/protocols/nhs-ester-labeling> (accessed: July 12, 2023).
10. Gorges T.M., Riethdorf S., von Ahsen O., Nastał Y.P., Röck K., Boede M., Peine S., Kuske A., Schmid E., Kneip C., König F., Rudolph M., Pantel K. Heterogeneous PSMA expression on circulating tumor cells: a potential basis for stratification and monitoring of PSMA-directed therapies in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016; 7 (23): 34930–34941.
11. Xia L., Wen L., Meng X., Zhou N., Guo X., Liu T., Xu X., Wang F., Zhu H., Yang Z. Application Analysis of <sup>124</sup>I-PPMN for Enhanced Retention in Tumors of Prostate Cancer Xenograft Mice. *Int J Nanomedicine*. 2021; 16: 7685–7695.
12. Dos Santos J.C., Schäfer M., Bauder-Wüst U., Beijer B., Eder M., Leotta K., Kleist C., Meyer J.P., Dilling T.R., Lewis J.S., Kratochwil C., Kopka K., Haberkorn U., Mier W. Refined Chelator Spacer Moieties Ameliorate the Pharmacokinetics of PSMA-617. *Front Chem*. 2022; 10: 898692.
13. Khokhlova A., Zolotovskii I., Pogodina E., Saenko Y., Stoliarov D., Vorsina S., Fotiadi A., Liamina D., Sokolovski S., Rafailov E. Effects of high and low level 1265 nm laser irradiation on HCT116 cancer cells. *Proceedings of the SPIE*. 2019; 10861.
14. Hennrich U., Eder M. [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved <sup>68</sup>Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021; 14 (8): 713.
15. Hennrich U., Eder M. [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 (Pluvicto™): The First FDA-Approved Radiotherapeutic for Treatment of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022; 15 (10): 1292.
16. Karimzadeh A., Heck M., Tauber R., Knorr K., Haller B., D'Alessandria C., Weber W.A., Eiber M., Rauscher I. <sup>177</sup>Lu-PSMA-I&T for Treatment of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Prognostic Value of Scintigraphic and Clinical Biomarkers. *J Nucl Med*. 2023; 64 (3): 402–409.

Received October 6, 2023; accepted January 11, 2023.

#### 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>.

**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>.

**Fomin Aleksandr Nikolaevich**, Candidate of Sciences (Engineering), Senior Researcher, S.P. Kapitsa Research Institute of Technology, Ulyanovsk State University. 432017, Russia, Ulyanovsk, L. Tolstoy St., 42; e-mail: mr.fominan@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0826-1857>.

**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 E.D., Rastorgueva E.V., Fomin A.N., Saenko Yu.V. Issledovanie predshestvennika radiofarmpreparata, natselennogo na prostat-spetsificheskii membrannyi antigen [Study of a radiopharmaceutical precursor targeting prostate-specific membrane antigen]. *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal*. 2024; 1: 162–171. DOI: 10.34014/2227-1848-2024-1-162-171 (in Russian).