

УДК 615.076.7

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО ПЕПТИДА, МЕЧЕНОГО РАДИОНУКЛИДОМ ЛУТЕЦИЕМ-177, В КУЛЬТУРЕ ПСМА-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОКА.А. Прач¹, Ф.Ш. Юладшева¹, Г.Е. Янович²

Научный руководитель: доцент, к.х.н., Е.В. Плотников

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050²Сибирский государственный медицинский университет,
Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, 634050

E-mail: nastya.prach@mail.ru

STUDY OF A NEW LUTETIUM-177-LABELED PEPTIDE IN THE CULTURE OF PSMA-EXPRESSING CANCER CELLSA.A. Prach¹, F.S. Yuldasheva¹, G.E. Janovich²

Scientific Supervisor: Assoc. Prof., PhD., E.V. Plotnikov

¹Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050²Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow trakt str., 2, 634050

E-mail: nastya.prach@mail.ru

Abstract. *In the present study, we developed a method for obtaining a conjugate labeled with the therapeutic radionuclide lutetium-177. It was evaluated the specificity of binding and in vitro internalization of a radiopharmaceutical based on the original PSMA-targeted ligand molecule.*

Введение. Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее часто диагностируемых злокачественных новообразований у мужчин. При этом ежегодно регистрируется 1,3 миллиона случаев заболевания во всем мире [1]. Однако, большинство опухолей в конечном итоге перерастают в метастатический резистентный к кастрации рак предстательной железы, который является последней стадией в РПЖ и основной причиной смерти [2].

Простатспецифический мембранный антиген (ПСМА) сверхэкспрессируется в 90 % случаев метастатического рака предстательной железы [3], при этом имеет небольшое содержание в нормальных тканях (почки, тонкий кишечник, слюнные и слезные железы). Этот факт превращает ПСМА в высокоспецифичный биомаркер РПЖ. Разработка и оптимизация новых молекул-лигандов, нацеленных на ПСМА с оптимальными для диагностики и терапии характеристиками, является актуальной темой для исследования.

Таким образом, целью данной работы является разработка методики получения и оценка специфичности связывания и интернализации *in vitro* радиокомплекса на основе оригинальной молекулы-лиганда, нацеленной на ПСМА для лечения рака предстательной железы.

Экспериментальная часть. Для мечения ¹⁷⁷Lu лиганд (PS-212) растворяли в смеси воды и 20 % диметилсульфоксида (ДМСО) до концентрации 1 нмоль/мкл. К 1-10 нмоль PS-212 добавляли буфер ацетата аммония (50-150 мкл, 0,2 М, pH 5,5) с последующим добавлением раствора ¹⁷⁷LuCl₃ (5 мкл, 25 МБк). Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 85 °С.

Для исследования специфичности связывания использовались две клеточные линии: экспрессирующие и не экспрессирующие ПСМА рецептор. Культуру РПЖ не экспрессирующую ПСМА - РС3 (ATCC; LGC Promochem, Бурос, Швеция) культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, пенициллина 100 МЕ/мл и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °С и в атмосфере 5 % CO₂. Гиперэкспрессирующий вариант клеточной линии РС3 – РС3-rip, был культивирован в двух типах среды RPMI: 1) 20 % эмбриональной бычьей сыворотки, 1 % L-глутамина и 1 % PEST (пенициллин и стрептомицин); 2) 20 % эмбриональной бычьей сыворотки, 1 % L-глутамина и 1 % PEST и 10 мкг/мл пиромидина. Вторую среду использовали каждый второй пассаж для поддержания селекции клонов. Для типичного эксперимента клетки высевали за сутки до эксперимента в чашки Петри в количестве 1×10⁶ клеток/чашку.

Специфичность *in vitro* тестировали методом насыщения. Перед экспериментом старую среду удаляли и клетки промывали 1 мл раствора PBS. В 6-луночный планшет с клетками добавляли немеченный PSMA-617 (100 нМ) и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. После этого во все чашки с клетками добавляли меченный конъюгат до концентрации 1 нМ и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После одночасовой инкубации клетки промывали 1 мл раствора PBS, открепляли 0,5 мл трипсина и собирали.

Для исследования интернализации PS-212 с радиоактивной меткой клетки РС3-rip и РС3 клетки инкубировали с 1 нМ исследуемым веществом в среде RPMI при 37 °С (5 % CO₂) и в заданные часовые точки (1, 2, 4, 6 и 24 ч) собирали среду и клетки промывали раствором фосфатного буфера (PBS). Клетки обрабатывали 1 мл 4 М раствора мочевины в 0,2 М глициновом буфере, pH 2,5, в течение 5 минут на льду. После этого собирали кислые фракции в пробирки и дважды промывали клетки PBS. Для лизиса клеток добавляли 1 мл 1 М раствора гидроксида натрия, инкубировали при 37 °С не менее 30 мин, соскребали клетки с чашки и собирали, промывали 1 мл и собирали в основную фракцию.

Радиохимический выход (РХВ) и радиохимическую чистоту (РХЧ) оценивали тонкослойной радио-хроматографией на ТСХ-сканере (ELYSIA Raytest. Model: Gamma BGO-V, Detector +miniGita, Германия) в среде 0,2 М лимонной кислоты. Для измерения активности использовался автоматизированный гамма-счетчик с NaI(Tl) детектором (2480 Wizard, PerkinElmer, США).

Результаты. РХВ (рис. 1) и РХЧ образца молекулы-лиганда к ПСМА PS-212, меченного ¹⁷⁷Lu составили 100%. Дополнительная очистка меченного конъюгата не требуется.

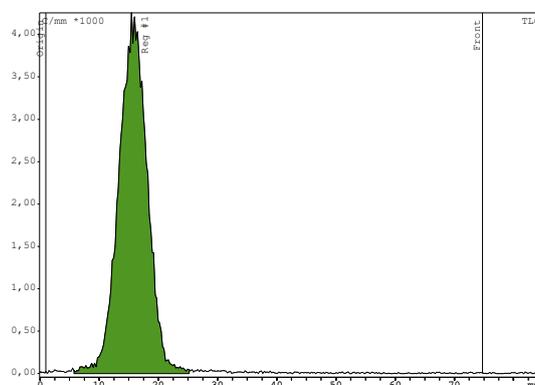


Рис. 1. Радиохроматограмма конъюгата ¹⁷⁷Lu-PS-212

Результаты определения специфичности связывания *in vitro* показаны на рисунке 2. Связывание с ПСМА-экспрессирующими клетками РС-3 было значительно ниже ($p < 5 \times 10^{-5}$) после насыщения рецепторов ПСМА в заблокированных группах, связывания с клетками РС-3 не было обнаружено, что указывает на то, что связывание было ПСМА-опосредованным.

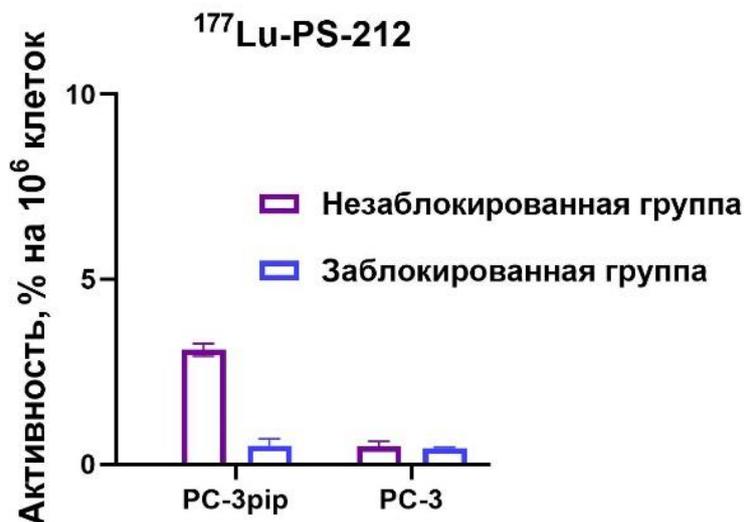


Рис. 2. Специфичность связывания ¹⁷⁷Lu-PS-212 с ПСМА-экспрессирующими клетками рака предстательной железы PC-3rip и неэкспрессирующими ПСМА рецептор клетками PC-3.

Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение для трех образцов

По результатам клеточного процессинга радиоактивность кислой фракции считается активностью, связанной с мембраной, основной фракции – интернализированной активностью. Интернализированная фракция составила 26 % от общей клеточно-ассоциированной активности через 24 часа. Ассоциированная с клеткой активность и интернализированная активность увеличивались со временем, при этом были достаточно медленными.

Заключение. Таким образом, связывание *in vitro* ¹⁷⁷Lu-PS-212 с ПСМА-экспрессирующими клетками PC-3rip было насыщаемым, т.е. специфичным. Эти результаты дают основу для дальнейших исследований *in vivo* с целью изучения биораспределения меченого конъюгата в мышинных моделях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giraudet L., Kryza D., Hofman M., Moreau A., Fizazi K., Flechon A., Hicks R.J., Tran B. PSMA targeting in metastatic castration-resistant prostate cancer: where are we and where are we going? // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. – 2021. – V. 13. – P. 1-14.
- Wang F., Li Z., Feng X., Yang D., Lin M. Advances in PSMA-targeted therapy for prostate cancer // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. – 2022. – V. 25., №. 1. – P. 11-26.
- Paschalis A., Sheehan B., Riisnaes R., Rodrigues D.N., Gurel B., Bertan C., Johann .S. de Bono. Prostate-specific membrane antigen heterogeneity and DNA repair defects in prostate cancer // *Eur Urol*. – 2019. – V. 76. – P. 469-478.