

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КОНЬЮГАТЫ НА ОСНОВЕ ЛИГАНДОВ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕМБРАННОГО АНТИГЕНА КАК ЭФФЕКТИВНОЕ СРЕДСТВО ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Обзор

© 2023 А.А. Успенская^{1*}, П.А. Красников¹, А.Г. Мажуга^{1,2,3},
Е.К. Белоглазкина¹, А.Э. Мачулкин^{1,4}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: uspenskaya.n@gmail.com

² Университет науки и технологий МИСИС, 119049 Москва, Россия

³ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Россия

⁴ Российский университет дружбы народов, 117198 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.02.2023

После доработки 17.05.2023

Принята к публикации 19.05.2023

Флуоресцентные красители находят широкое применение в гистологических исследованиях и в интраоперационной хирургии, в том числе против такого заболевания как рак предстательной железы (РПЖ), который на сегодняшний день является одним из самых распространённых видов онкологических новообразований среди мужчин. Адресная доставка флуоресцентных конъюгатов позволяет в значительной степени повысить эффективность диагностики и своевременно поставить правильный диагноз. В случае РПЖ белком-маркером является простатический специфический мембранный антиген (ПСМА). На сегодняшний день большое количество диагностических конъюгатов, направленных на ПСМА, создаётся на основе модифицированных мочевины. Обзор посвящён узконаправленным конъюгатам, селективно связывающимся с ПСМА, и отвечает на актуальные вопросы. Какие флуоресцентные красители уже используются в области РПЖ-диагностики? Какие факторы влияют на соотношение структура–активность конечной молекулы? На что стоит обратить внимание при выборе флуоресцентной метки для создания новых диагностических конъюгатов? И что можно предложить в данной области на сегодняшний день?

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак предстательной железы, простатический специфический мембранный антиген, ПСМА, флуоресцентные красители, адресная доставка.

DOI: 10.31857/S0320972523070084, **EDN:** FXJIKB

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи современной науки в борьбе с онкологическими заболеваниями, рак до сих пор является одной из основных социально значимых проблем здравоохранения. Разработана большая палитра методов лечения и диагностики злокачественных новообразований: химиотерапия (в том числе адресно-направленная), иммунотерапия, диагностика и терапия с помощью

радиофармпрепаратов, гистологические исследования (биопсия), хирургическое вмешательство (трансплантация костного мозга, интраоперационная хирургия) и т.д. Гистологические исследования являются важнейшим методом диагностики, который позволяет точно установить природу тех или иных тканей. Зачастую постановка диагноза осуществляется именно на основании данного типа исследования. Разрабатывая эффективные, а главное доступные препараты-красители онкологических

Принятые сокращения: РПЖ – рак предстательной железы; ПСМА – простатический специфический мембранный антиген; DCL/ACUPA – N-[N-[(S)-1,3-дикарбоксипропил]карбамоил]-(S)-1-лизин; DOTA – додекантетрауксусная кислота; DUPA – 2-[3-(1,3-дикарбоксипропил)уреидо]-пентадионовая кислота; MAG₃ – меркаптоацетилтриглицин.

* Адресат для корреспонденции.

маркеров, мы можем ускорить и повысить пропускную способность, точность и надежность данного метода. Высокоселективные флуоресцентные конъюгаты имеют решающее значение и для интраоперационной хирургии. При синтезе новых конъюгатов, направленных на простатический специфический мембранный антиген (ПСМА), исследователю важно понимать, какие флуоресцентные красители уже были использованы для данной цели; что важно учитывать с точки зрения фармакокинетики конъюгатов; на какие физико-химические свойства флуоресцентных меток стоит обратить внимание и как они могут сказаться на биологической активности всей молекулы; какие синтетические подходы лучше всего себя зарекомендовали, а также какие новые актуальные направления можно предложить, опираясь на исследования последних 5 лет. Цель обзора – помочь исследователю ответить на данные вопросы.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КОНЪЮГАТЫ НА ОСНОВЕ ЛИГАНДОВ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕМБРАННОГО АНТИГЕНА

В силу того, что современные методы оптической визуализации не позволяют в полной мере идентифицировать изменения в тканях из-за невысокой проникающей способности видимого излучения, при амбулаторной диагностике используется, как правило, ПЭТ/КТ с соответствующими контрастными реагентами, содержащими радионуклидные метки. Однако использование радиофармпрепаратов для интраоперационной хирургии представляет ряд сложностей. Они связаны с получением, хранением и временем жизни радионуклидов, а также с продуктами их распада. Альтернативным методом визуализации злокачественных новообразований стало использование флуоресцентных красителей [1]. Преимуществами данных соединений являются: длительность хранения, скорость обнаружения, отсутствие радиоактивности, и, следовательно, не происходит облучения как пациента, так и персонала [2]. Тем не менее при создании диагностических конъюгатов на основе флуоресцентных красителей необходимо соблюдать диапазон окон прозрачности биологических тканей, чтобы избежать влияния их автофлуоресценции и поглощения самой тканью [3]. Оптимальными длинами волн как испускания, так и поглощения являются 2 интервала: 700–900 нм (первое окно ближнего инфракрасного диапа-

зона в биологической ткани, NIR-I) и 1000–1350 нм (второе окно прозрачности). К большому сожалению, автофлуоресценция сильно ограничивает область применения флуоресцентных красителей, и если при гистологии и исследованиях *in vivo* на мелких грызунах их использование не вызывает сложностей, то ввиду значительного объема человеческих тканей диагностика пациентов на сегодняшний день осуществляется, как правило, с использованием радиофармпрепаратов.

Согласно современной статистике по онкологическим заболеваниям среди мужчин, рак предстательной железы (РПЖ) находится на втором месте после рака лёгких [4]. Одним из белковых маркеров данного заболевания является ПСМА. Высокая экспрессия данного белка в злокачественных новообразованиях предстательной железы сделали его хорошей мишенью для направленной доставки биологически активных органических соединений.

В настоящее время существует два основных класса лигандов ПСМА: аналоги субстрата и аналоги переходного состояния. Аналогами переходного состояния являются фосфиновые кислоты (например, 2-(фосфонометил)-пентадионовая кислота (2-РМРА)) [5], и тиолы (например, 2-(3-меркаптопропил)-пентадионовая кислота (2-МРРА)) [6]. Ожидается, что первые диагностические конъюгаты с флуоресцентными агентами представлены на основе лигандов-векторов различного типа: как на основе аналогов переходного состояния, так и на основе аналогов субстрата. Последние представляют собой различные типы мочевины, но наибольшее распространение получили 2-[3-(1,3-дикарбоксипропил)уреидо]-пентадионовая кислота (DUPA) и N-[N-[(S)-1,3-дикарбоксипропил]карбамоил]-(S)-l-лизин (DCL) [7, 8]. С дальнейшим развитием векторов на основе мочевины и доказательств того, что такие лиганды обладают преимуществами перед лигандами-аналогами переходного состояния, стало синтезироваться большое количество конъюгатов на основе векторов аналогов субстрата. Преимущества обусловлены в основном фармакокинетическим профилем в условиях *in vivo*. Применение конъюгатов на основе аналогов переходного состояния требовало, как правило, очень больших доз (в силу недостаточной селективности), что вызывало опасения относительно побочных эффектов, в том числе связанных с иммунной системой [9]. DUPA и DCL стали самыми известными среди аналогов субстрата благодаря своей высокой специфичности к ПСМА. Попытки оптимизировать структуру путём замены аминокислот,

образующих мочевины, как правило, не приводило к «сверхаффинности». Например, замена лизина в структуре DCL на фрагмент диаминопимелиновой кислоты приводит к резкому ухудшению показателей аффинности [10].

Из большого разнообразия флуоресцентных красителей для создания конъюгатов против РПЖ чаще всего используются такие классы, как карбоцианины (Cy5, Cy7 и др.), флуоресцеины (FITC, FAM, FAM-5 и др.) и их аналоги. Главными требованиями к флуоресцентным меткам являются: удобный диапазон детектирования (видимый спектр), метаболическая стабильность, отсутствие токсичности. Их слабым местом, как и многих диагностических и терапевтических агентов, является специфичность на тот или иной тип ткани. Попадая в кровоток, будучи немодифицированными, такие вещества, как правило, либо быстро вымываются почками, либо распределяются по всему организму, не проявляя какой-либо специфичности. Конъюгирование диагностических агентов с векторными молекулами, направленными на простатический специфический мембранный антиген, даёт возможность получить эффективное средство визуализации РПЖ, а также некоторых других видов онкологии и их метастазов.

В данном обзоре термином «моноконъюгат» называются структуры, которые несут в себе по одному лиганду ПСМА и диагностическому агенту. Эти две основные части могут быть связаны между собой линкером, который, однако, может и полностью отсутствовать [11].

Активный центр ПСМА представляет собой два атома цинка, к которым ведёт воронкообразный туннель с различными гидрофобными или гидрофильными субкарманами. Если биологически активная молекула имеет небольшой размер, то, будучи соединённой с вектором, она (в составе конъюгата) без проблем войдёт в воронкообразную структуру белка, где дальше произойдёт связывание и поглощение конъюгата клеткой путём рецепторопосредованного эндоцитоза. Однако если структура диагностической метки массивная и разветвлённая, то при недостаточном расстоянии между ней и вектором возникнут стерические затруднения, которые не позволят вектору достигнуть активного центра, и вместо поглощения клеткой будет происходить вымывание конъюгата из тканей.

Чтобы лучше проследить динамику развития рассматриваемых соединений, остановимся на более ранних конъюгатах, полученных с использованием ингибиторов переходного состояния [12, 13]. В качестве векторной систе-

мы был взят лиганд GPI (2-[(3-амино-3-карбоксивопропил)(гидрокси)фосфинил)-метил]пентан-1,5-дионовая кислота) с показателем $K_i = 9$ нМ. Авторы отмечают резкое возрастание аффинности после конъюгирования ингибитора с флуоресцентной меткой до 0,4 нМ. Данный эффект следует объяснить следующим образом: как только конъюгат попадает в целевой белок, ингибитор GPI связывается с ним в активном центре. Флуоресцентная же часть, представленная IRDye78, остаётся и взаимодействует с субкарманами воронкообразного туннеля, тем самым обеспечивая дополнительную аффинность к ПСМА (рис. 1, а). Чтобы проверить это, авторы статьи провели исследование накопления немодифицированной метки. K_i в данном случае составило 500 нМ, что позволяет говорить о некотором неспецифическом накоплении. Стоит понимать, что структура красителя при этом всё равно является достаточно разветвлённой и массивной, и то, что в одном случае его молекула смогла проникнуть в белок-мишень, не гарантирует, что при незначительном изменении структуры будут достигнуты такие же высокие показатели связывания. Действительно, при проверке авторами других красителей наблюдалось следующее: чем меньше в структуре метки сульфогрупп, тем больше падала активность. Это показывает, что флуоресцентный краситель может выполнять две функции одновременно: обеспечивать визуализацию и повышать сродство конъюгата к ПСМА за счёт взаимодействия с ним.

Стоит отметить, что и немодифицированные флуоресцентные лиганды показывают весьма средние значения аффинности. Хорошая селективность конъюгатов относительно ПСМА-экспрессирующих клеток доказывает, что связывание обеспечивается и за счёт активной молекулы [14, 15]. Например, константа ингибирования для Cys-C(O)-Glu составляет 376 ± 195 нМ, а для 800CW-SCE она составляет $13,2 \pm 2,35$ нМ (рис. 1, б). Чем больше участков взаимодействия с активным центром ПСМА и ведущим к нему туннелю, тем большую эффективность стоит ожидать от конъюгатов.

Основываясь на данном наблюдении, были разработаны флуоресцентные красители, чувствительные к своему молекулярному окружению – молекулярные ротаторы [16, 17]. Такие структуры, будучи в несвязанном состоянии, не являются флуорофорами. Взаимодействуя с аминокислотными остатками, которые выстилают входную воронку ПСМА, меняется пространственное положение молекулярного ротатора, что переводит его во флуоресцентную

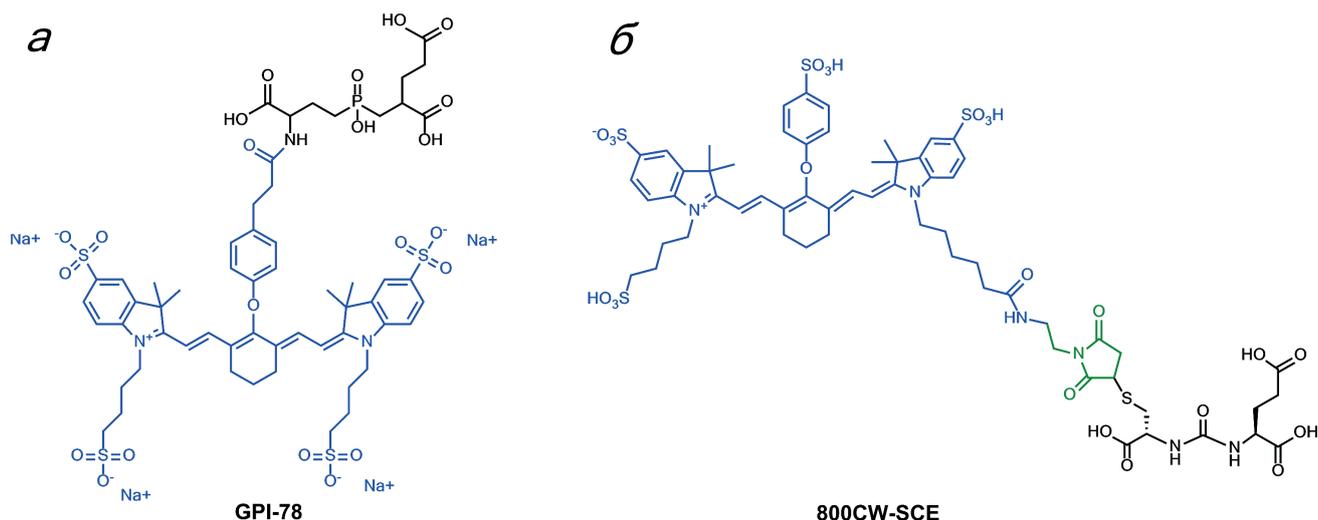


Рис. 1. Примеры структур флуоресцентных конъюгатов. *a* – Структура конъюгата GPI-78; *б* – структура конъюгата 800CW-SCE: лиганды ПСМА выделены чёрным цветом, линкеры – зелёным, флуоресцентные метки – синим

форму [18]. Такой пример мы можем видеть в недавней работе Zhang et al. [19], где в качестве лиганда была взята мочевиная DCL, а в качестве действующих агентов взяты метки ODAP-436, ODAP-490 и Glu-490 (рис. 2). Изучение внутримолекулярных взаимодействий показало, что связывание лиганда мочевины с активным центром ПСМА происходит согласно изученному механизму и не подвергается влиянию со стороны остальной части конъюгата. Активация ротора (вращения связей флуорофора под влиянием молекулярного окружения) происходит в непосредственной близости от активного центра, нитрильная группа ложится в глубокий карман, находящийся там, и относительно жёстко фиксирует молекулу во флуоресцирующем состоянии.

Главным преимуществом таких конъюгатов является то, что флуоресценция активируется только после связывания с белком-мишенью, и это даёт очень высокую контрастность визуализации за счёт увеличения разницы между фоновым накоплением метки в организме и злокачественным новообразованием. Помимо этого, соединения показывают очень высокую аффинность (63–118 пМ) на клеточных линиях LNCaP (ПСМА++) и 22Rv1 (ПСМА+). Однако имеются сложности в фармакологическом профиле *in vivo*, так как основное накопление происходило в почках или печени. В настоящее время ведутся исследования по решению данной проблемы. Трудности в биодоступности конъюгатов на основе антител могут быть обусловлены их разложением под действием различных протеаз, ответом иммунной системы и т.д. Возможно, авторам таких роторных флуоресцентных меток следует по-

менять антитело на низкомолекулярный вектор. Помимо хорошей устойчивости *in vivo*, низкомолекулярные лиганды обладают рядом других преимуществ. При сопоставимой с антителами аффинности их проще получить синтетически, такие синтезы можно масштабировать, при этом производство таких препаратов будет дешевле.

Вообще, система активации флуоресцентных меток непосредственно в опухолевых тканях активно набирает популярность. Интерес представляет работа 2022 года по получению флуоресцентных меток, производных родамина, которые активируются УФ-излучением уже непосредственно в опухолевых тканях [20]. Флуоресценция возникает в ходе радикального механизма: флуоресцентно неактивный ксантон преобразуется в четырёхчленный цикл. Донором радикалов выступает фрагмент диарилкетона, а акцептором – фрагмент стирила. Данные структуры позволяют проводить многочисленные модификации, причём некоторые из них значительно улучшают фотохимические свойства. Например, для некоторых соединений квантовый выход составляет 0,92. В работе проведены значительные исследования визуализации, начиная с изучения накопления в органеллах клетки (тубулиновые трубочки, митохондрии и лизосомы), заканчивая конъюгированием с векторными молекулами для селективного накопления в определённых клеточных линиях. Например, проводили исследование аффинности на клеточной линии U2OS (эпителиальные клетки остеосаркомы костей человека) конъюгатами меток PaX560 с самомаркирующимися белковыми метками HaloTag. Результаты показали

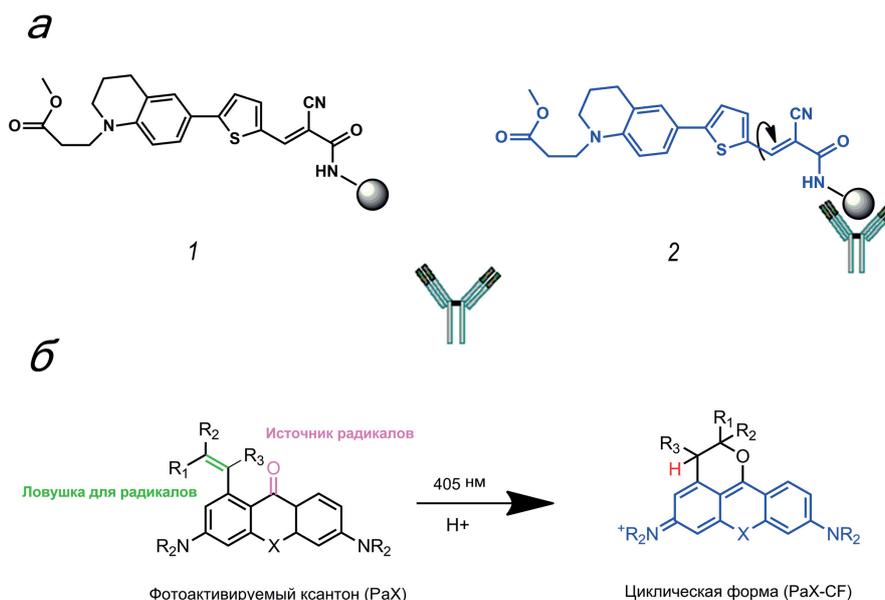


Рис. 2. Примеры флуоресцентных меток, способных переходить во флуоресцентное состояние под воздействием различных факторов. *а* – Схема работы молекулярных роторов при взаимодействии с ПСМА: 1 – конъюгат, не вступивший во взаимодействие с белком-мишенью, флуоресценция отсутствует; 2 – конъюгат, связанный с белком-мишенью, окружение белка меняет конфигурацию соединения, переводя его в состояние активной флуоресценции. *б* – Схема перехода ксантона (PaX) в активную циклическую форму по радикальному механизму. Флуоресцирующие формы выделены синим цветом

большую селективность и хорошее разрешение получаемой визуализации. Такие флуоресцентные фотоактивируемые метки очень интересны и имеют большой потенциал. Авторы статьи синтезировали несколько NHS-эфиров PaX-производных, что даёт возможность сконъюгировать их с ПСМА-направленными мочевидами, чего не было проделано в данном исследовании. Тем не менее создание конъюгатов PSMA-PaX является многообещающей задачей. Опираясь на уже проведённые исследования, стоит предположить, что введение таких меток в структуру конъюгатов ПСМА лучше осуществлять через пептидный линкер. Так как структура флуорофора под действием УФ-света изменяется, это может сильно сказаться на аффинности к белку, и если он уже внутри туннеля, то, возможно, эти изменения приведут к изменению аффинности. Имеет смысл провести моделирование и расчёты перед синтезом, чтобы лучше спланировать структуру таких конъюгатов. Так как на платформе ПСМА-векторов возможно создавать и бимодальные конъюгаты, с PaX-метками можно создавать двойные конъюгаты со стандартными флуоресцентными красителями, имеющими сходные спектральные свойства. Таким образом, можно достичь усиления сигнала и снизить влияние обесцвечивания, которое происходит со «всегда активными» красителями.

Итак, мы видим, что конъюгирование может привести как к так называемой «синергии» со стороны биологической активности, так и к абсолютно обратному эффекту. В лучшем случае мы получим биологическую активность конъюгата, сопоставимую с немодифицированным ингибитором. В худшем – мы можем получить полностью биологически неактивную молекулу, несмотря на то что до конъюгирования исходные составляющие показывали высокие показатели аффинности. В связи с этим другой эффективной стратегией будет введение линкера между векторной молекулой и красителем. Доказано, что конъюгаты такой структуры дают больше возможностей для применения и модификаций. Получив высокоаффинный к белку-мишени тандем, векторная молекула–линкер, можно легко менять биологически активную компоненту. И, например, после успешной визуализации, создать конъюгат с такой же адресной системой доставки, но уже с терапевтическим агентом. Безусловно, в фармакокинетических свойствах между диагностическими и терапевтическими конъюгатами будут наблюдаться некоторые отличия, тем не менее высокоаффинная платформа намного ускорит получение новой эффективной химиотерапии.

В синтетическом плане реализация таких структур не представляет большой сложности. Многие флуоресцентные красители весьма просто модифицировать алифатическими це-

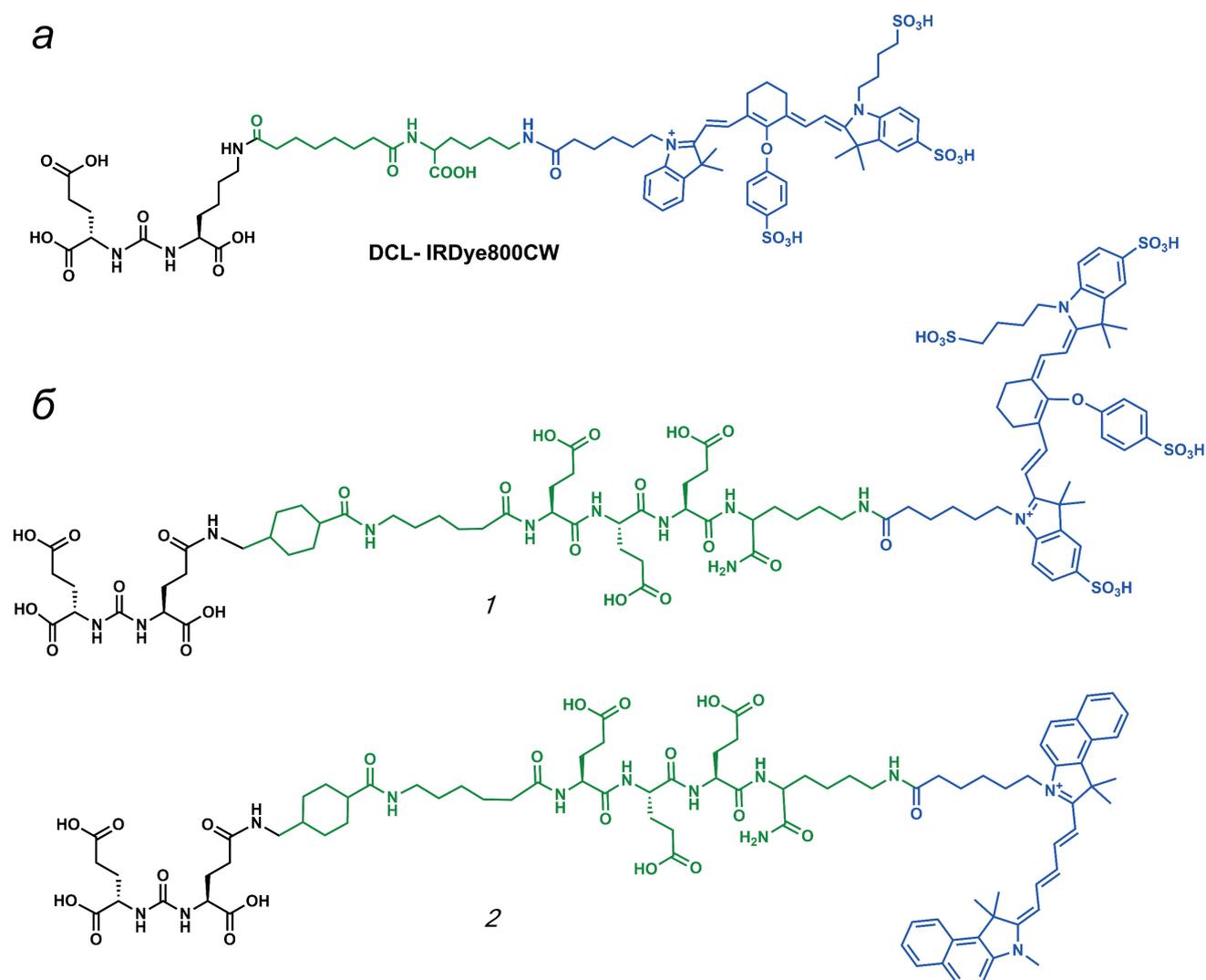


Рис. 3. Примеры флуоресцентных конъюгатов. *a* – Структура конъюгата DCL–IRDye800CW. *б* – Структуры конъюгатов на основе векторной молекулы DCPA (чёрный) с флуоресцентными красителями IRDye800 и Cy5.5 (синий). Лиганд ПСМА выделен чёрным цветом, флуоресцентная метка – синим

почками с различными функциональными группами, удобными для последующих реакций конъюгирования, например, путём клик-реакций азид-алкинового циклоприсоединения, реакций пептидного синтеза и др. При этом модификации практически абсолютно не сказываются на флуоресцентных характеристиках красителя (длина волны поглощения, длина волны эмиссии, Стоксов сдвиг и др.), но не стоит забывать о физико-химических свойствах, например, водорастворимости. Она является важнейшим критерием препаратов, потому что от неё зависит биодоступность веществ; оптимальная концентрация, вводимая в кровоток и др. Чтобы проходить через клеточные мембраны, конъюгат должен быть относительно неполярным, однако, чтобы хорошо растворяться в воде, в то же время конъюгат должен содержать в своём составе полярные

фрагменты. Оптимальный баланс полярности и растворимости является обязательным условием при создании новых биологически активных агентов. В настоящий момент большая палитра модифицированных для различных синтетических схем красителей является коммерчески доступной.

Рассматривая лиганды-векторы, направленные на РПЖ, можно отметить, что здесь также за последние 20 лет были достигнуты большие успехи. Синтетические подходы многогранны, их можно разделить на классический синтез в растворе и методы твердофазного синтеза. Последний набирает всё большую и большую популярность, так как позволяет значительно экономить время, уменьшать количество побочных продуктов, что немаловажно, учитывая высокие требования к чистоте конъюгатов для биологических испытаний.

Тем не менее не стоит вычёркивать из практики классический пептидный синтез в растворе. К его преимуществам можно отнести возможность контроля на промежуточных стадиях синтеза, реактивы в этом методе расходуются меньше, при этом, как правило, являются более коммерчески доступными. Помимо этого, в данном случае намного легче провести масштабирование синтеза.

Таким образом, можно подвести следующий итог относительно планирования синтеза ПСМА-лигандов. Если перед исследователем стоит задача получить большую библиотеку, представляющую собой варьирование того или иного элемента структуры, то предпочтительнее остановиться именно на твердофазных методах синтеза. Это позволит получить целевые соединения быстро, эффективно и в достаточном количестве для физико-химического анализа и биологических испытаний. Если же цель заключается в масштабировании и разработке нескольких заданных структур, то в этом случае более целесообразно выбрать классический пептидный синтез в растворе.

В обоих случаях синтез превращается в своего рода «конструктор», позволяющий собирать довольно массивные молекулы. Например, можно получить не просто направленную молекулу мочевины, а лиганд с уже присоединённой линкерной структурой, которую можно менять и корректировать, ограничиваясь только возможностями пептидного синтеза.

Первые линкеры в структурах ПСМА-лигандов представляли собой алифатические цепочки, которые выполняли исключительно функцию «моста». Флуоресцентный конъюгат с меткой IRD был получен в научно-исследовательской группе Chen et al. [21] (рис. 3, а). Конъюгат на основе ингибитора мочевины DCL и метки IRDye800CW получили классическим синтезом через NHS-эфиры.

Исследование *in vitro* и *in vivo* (модели ксенотрансплантатов на мышах) проводили на 2 клеточных линиях: PC-3-PIP (ПСМА +) и PC-3 (ПСМА –). Высокое накопление флуоресцентного сигнала в почках свидетельствует о выведении конъюгата через мочу. Также стоит отметить, что большое влияние оказывает подбор дозирования в условиях *in vivo*. Превышение дозы может приводить к неспецифическому окрашиванию ввиду естественного распределения препарата по кровяному руслу и тканям, в то время как доза должна быть подобрана так, чтобы сигнал от флуоресценции накапливался исключительно в экспрессирующих тканях в достаточных для детектирования количествах, а несвязанный препарат в кровя-

ном русле и тканях не превышал фоновых значений.

Тем не менее, опираясь на всё более подробные данные о строении ПСМА, а также уже имея представление о том, что сами флуоресцентные метки оказывают дополнительное взаимодействие, оставлять просто алифатический фрагмент в воронкообразном участке ПСМА является нецелесообразным. Введение ароматических или отрицательно заряженных групп в туннель перед активным центром улучшает аффинность, а значит имеет смысл ввести их и в структуру линкера.

В качестве хорошего примера стоит рассмотреть работу, в которой были получены конъюгаты с метками IRDye800 (1) и Cy5.5 (2) (рис. 3, б). В основу лиганда легла мочевиная DURA, которую модифицировали циклогексинаминовым фрагментом с последующим введением трипептидной цепочки [22].

Лучшую аффинность показал конъюгат 1 с флуоресцентной меткой IRDye800, у которого значение IC_{50} составило $1,53 \pm 0,14$ нМ. Однако и конъюгат 2 с меткой Cy5.5 показал высокую аффинность ($IC_{50} = 2,07 \pm 0,13$ нМ). Это показывает, что лиганд с трипептидным линкером хорошо связывается с активным центром ПСМА, и полученные конъюгаты могут быть взяты на испытания *in vivo*. Исследования проводились на мышах с привитыми ксенографтами ПСМА положительных (PC-3-PIP) и отрицательных (PC-3-FLU) линий. Как конъюгат 1, так и конъюгат 2 показали отличную селективность связывания с ПСМА-положительными опухолями PC-3-PIP с более чем 10-кратной разницей накопления между опухолями PC-3-PIP и PC-3-FLU. Из-за разницы в полярности (IRDye800 содержит на 4 отрицательно заряженные сульфогруппы больше, чем Cy5.5) препараты имеют разный фармакокинетический профиль. Максимальная концентрация в опухоли PC-3-PIP конъюгата 1 достигается через 4 часа после введения, в то время для конъюгата 2 – через 24 часа. Выведение обоих конъюгатов происходит через почки. Конъюгат 1 с флуоресцентной меткой IRDye800 довольно быстро вымывался из опухоли – за 24–120 часов. В отличие от этого, конъюгат 2 с флуоресцентной меткой Cy5.5 остаётся связанным с опухолью довольно продолжительное время и практически не изменяется в течение 5 дней после введения. Связано это может быть с различной липофильностью меток, обусловленной количеством сульфоксильных групп. Снижение липофильности в данном случае улучшает фармакокинетический профиль. Подтверждали высокую специфичность

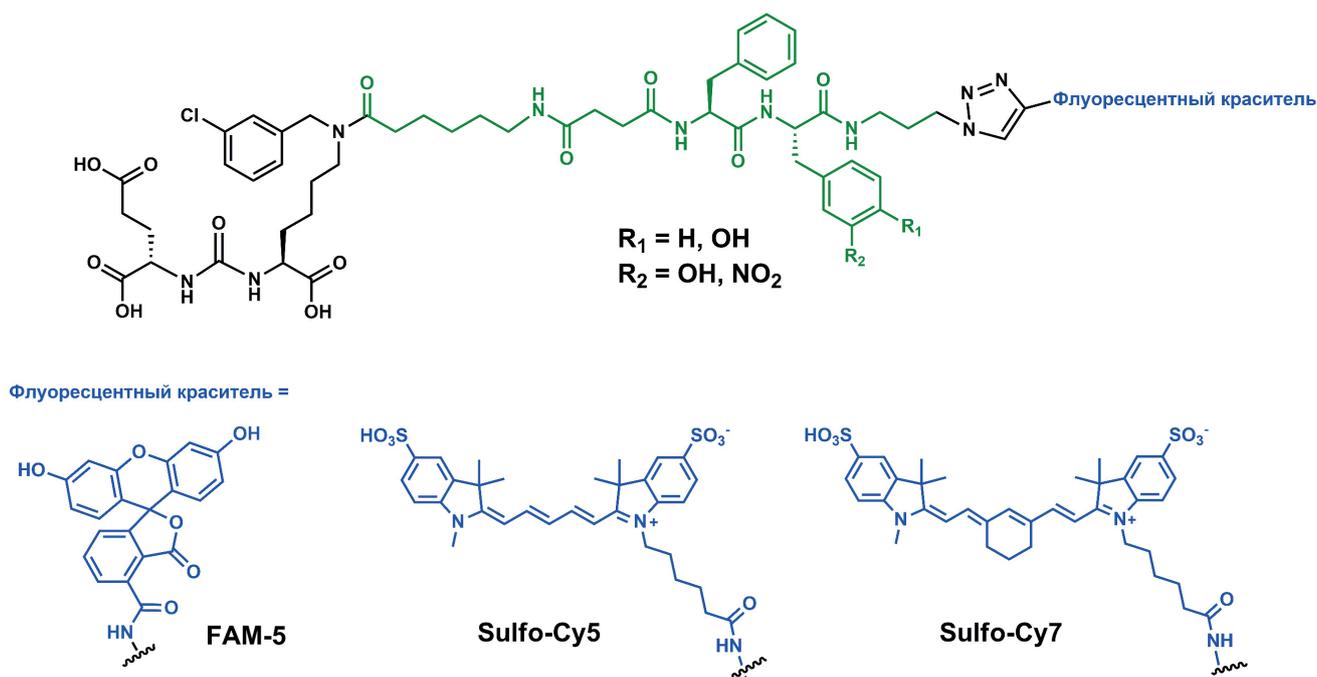


Рис. 4. Общая схема структуры флуоресцентных конъюгатов, полученных через реакцию азид-алкинового циклоприсоединения на основе векторной молекулы DCL (чёрный), линкером (зелёный) и флуоресцентными красителями FAM-5, Sulfo-Cy5, Sulfo-Cy7 (синий)

с помощью эксперимента с введением конъюгатов и 100-кратной дозы высокоаффинного конъюгата ПСМА ZJ-MCC-Ahx-YYYG [23]. В результате в обоих случаях практически не наблюдалось визуализации опухолевых тканей, а основное накопление флуоресцентных меток происходило в мочевом пузыре мышей. Мы видим, что для обеих структур значения IC_{50} сопоставимы и находятся в наномолярных пределах.

Варьирование флуоресцентных меток имеет важное значение, оно помогает использовать более широкую палитру красителей с различными физико-химическими свойствами, а, соответственно, расширяется и область применения. В целом, подход, который заключается в создании селективной к ПСМА базы с последующим применением разных флуоресцентных меток, можно видеть во многих других работах, что подтверждает его удобство. Отдельное место здесь занимают клик-реакции. Реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая солями меди (I) обладает рядом преимуществ, такими как: высокая селективность затрагиваемых групп, простота в реализации, хорошие выходы реакций [24, 25].

С помощью данного синтетического подхода на основе модифицированной ароматическим фрагментом при атоме азота лизина мочевины была создана серия конъюгатов с флуоресцентными метками Sulfo-Cy5,

Sulfo-Cy7 и FAM-5 (рис. 4). Чтобы улучшить аффинность за счёт взаимодействия с воронкообразным туннелем, в структуру линкера были введены дипептидные фрагменты на основе фенилаланина и тирозина [26]. Без флуоресцентной нагрузки лиганды показывают наномолярные значения активности в пределах 1–5 нМ [27]. Благодаря своим спектральным характеристикам (длины волн поглощения: λ_{\max} FAM-5 = 490 нм и λ_{\max} Sulfo-Cy5 = 646 нм) PSMA-SulfoCy5 имеет больший потенциал при использовании в качестве визуализирующего агента. Обусловлено это ограничениями, возникающими из-за прозрачности тканей для видимого света. Sulfo-Cy5 имеет максимум поглощения при 646 нм и расположен на краю окна NIR-I (первое окно ближнего инфракрасного диапазона в биологической ткани – 700–900 нм) [28].

Исследование проводили методом проточной цитофлуориметрии на 3 клеточных линиях 22Rv1 (ПСМА +), LNCaP (ПСМА ++) и PC-3 (ПСМА –). Для конъюгата L-Phe-L-Tyr-FAM-5 результаты были следующими: для клеточной линии LNCaP 83,8% клеток несли флуоресцентный сигнал; 22Rv1 были окрашены на 14,4%; наименьшее количество флуоресцентного сигнала несли клетки PC-3 – 7,6%. Для того чтобы подтвердить, что низкое накопление конъюгата на клеточной линии 22Rv1 связано с низкой экспрессией ПСМА в самих клетках, был проведён эксперимент по

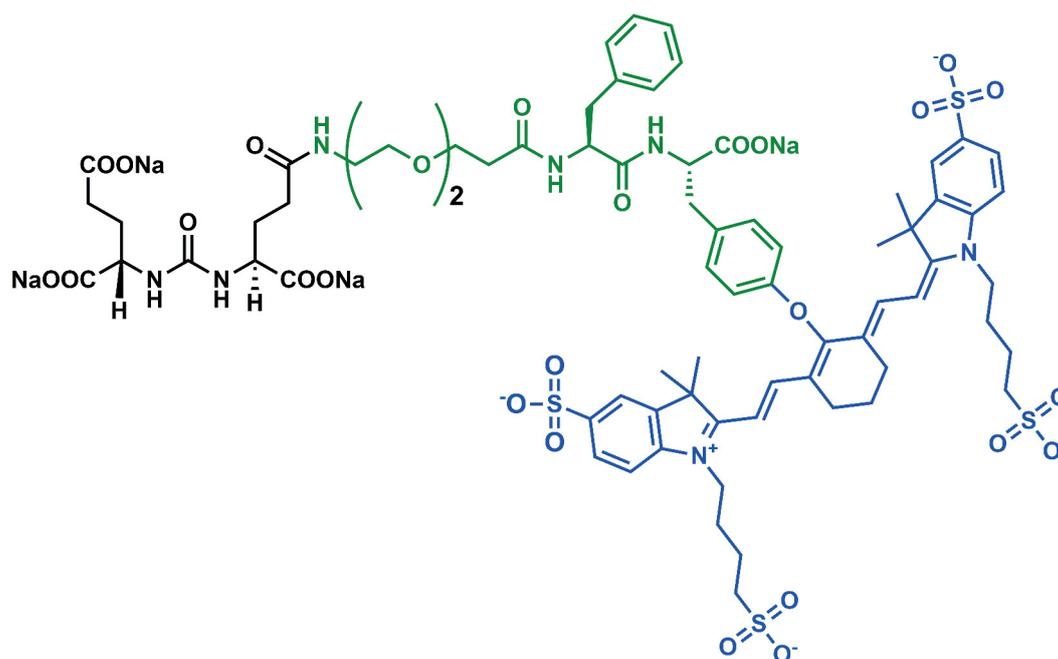


Рис. 5. Структура флуоресцентного конъюгата OTL7819, лиганд выделен чёрным цветом, линкер – зелёным, флуоресцентный краситель – синим

методике «блокирования». Для этого клеточные линии предварительно инкубировали в течение часа с лигандом L-Phe-L-Tyr, на основе которого были получены конъюгаты, но без флуоресцентной метки, с целью связать активные центры ПСМА. В результате накопление в клеточных линиях снизилось, особенно это заметно на ПСМА-положительной линии с высокой экспрессией – LNCaP. Таким образом, подтверждается, что окрашивание клеток происходит за счёт связывания конъюгатов с ПСМА. Полученные конъюгаты не были токсичны по отношению к клеточным линиям LNCaP и PC-3, за исключением конъюгата L-Phe-L-Tyr-Sulfo-Cy7, значения цитотоксичности которого составили 12,2 мкМ и 18,7 мкМ соответственно.

Для визуализации накопления флуоресцентного сигнала полученных конъюгатов *in vivo* была выбрана модель ксенотрансплантантов на мышах 22Rv1 и PC-3. В течение первого часа после введения препарата достоверных отличий между поглощением ПСМА-положительной и ПСМА-отрицательной опухолей не наблюдалось. Значительная разница стала наблюдаться по истечении 24 часов. Так как после введения большая часть конъюгата находилась в кровотоке, в первые часы наблюдалось увеличение фонового сигнала, который постепенно снижался по мере накопления в тканях и выведения из организма почками с мочой. Таким образом, за 24 часа из организма выводится весь неспецифически связанный

конъюгат. Поглощение наблюдалось только в тканях, экспрессирующих ПСМА, в частности, в ксенотрансплантатах 22Rv1. В этой области увеличение интенсивности сигнала происходило более чем в 2 раза.

Так как кожа и ткани активно поглощают свет, что приводит к ослаблению сигнала, в связи с этим дополнительно было проведено исследование *ex vivo*. Такие условия приближены к условиям интраоперационной диагностики при эксплоративной хирургии. Анализ поглощения *ex vivo* показал ещё большую разницу в накоплении сигнала. Среднее поглощение конъюгата в опухолях 22Rv1 было в 14 ± 2 раза выше, чем в опухолях PC-3.

Кроме того, стоит отметить, что в сравнении с недавно опубликованными работами была продемонстрирована хорошая визуализация на клеточной линии 22Rv1 с обоими конъюгатами при значительно меньшей дозе введения – 5 нмоль в 100 мкл (для конъюгата OTL7819 доза введения составляет 10 нмоль в 100 мкл) (рис. 5) [29].

Использование дипептидных цепочек на основе фенилаланина можно наблюдать и в других работах (рис. 6). На основе такого лиганда была получена серия диагностических конъюгатов на основе лиганда мочевины DUPA и меток DyLight680, IR800CW и Alexa Fluor 647 [30].

Соединение DyLight680 показало аффинность $K_i = 33$ нМ, Alexa Fluor – 4,5 нМ, IR800CW – 12 нМ. Примечательным данное

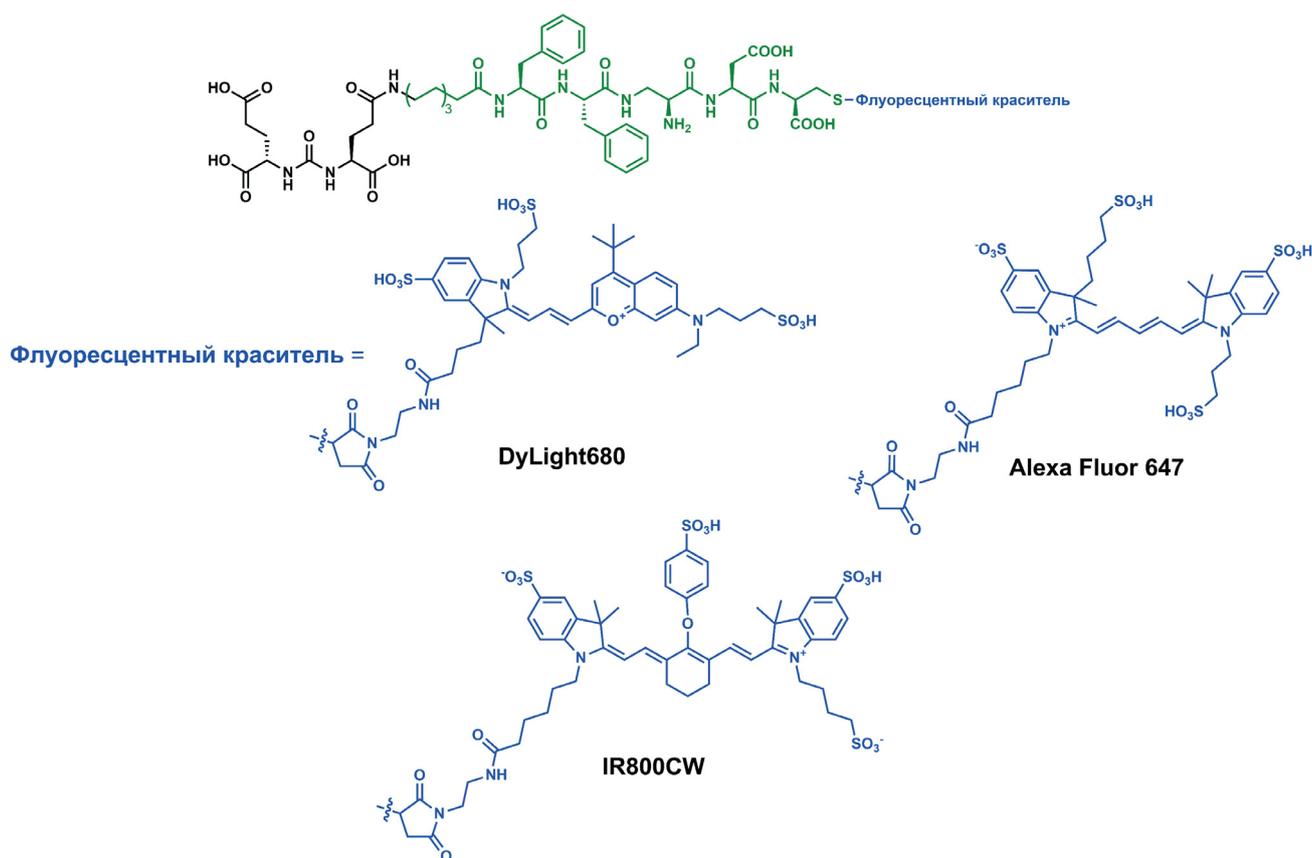


Рис. 6. Структура конъюгатов на основе векторного фрагмента DUPA (чёрный) и красителей DyLight680, Alexa Fluor 647 и IR800CW (синий) и полипептидного линкера (зелёный)

исследование делает то, что, помимо накопления в ПСМА-экспрессирующих ксенографтах, авторы провели эксперимент с изучением метастазирования. Для этого мышам внутрисердечно вводились опухолевые клетки 22Rv1 (ПСМА +), после чего мыши жили 4 недели с зарождающимися опухолями. Затем проводили введение флуоресцентных конъюгатов, умерщвление и визуализацию. Лиганды показали хорошее накопление в метастазах, значения аффинности практически не изменялись при переходе от метки к метке, что говорит о том, что структура метки находится вне области взаимодействия с белком-мишенью, и связывание хорошо обеспечивается векторной молекулой и линкером, а учитывая, что количество сульфоксильных групп в метках сопоставимо, нет большой разницы и в фармакокинетическом профиле. Таким способом, удалось визуализировать метастазы до 50 мкм с помощью камер высокого разрешения.

Помимо метастазов, ПСМА экспрессируется и в некоторых других случаях онкологических заболеваний, в том числе раке молочной железы, колоректальном раке, папиллярной почечно-клеточной карциноме. Здесь стоит сказать, что другое название ПСМА — глута-

маткарбоксипептидаза II (GCP II), и он присутствует и в здоровых клетках, отвечая за метаболизм фолиевой кислоты и гидролиз N-ацетиласпартилглутамата. Также GCP II присутствует в мозге и ЦНС, и в этом случае обозначается как N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматпептидаза I (NAALADase I). Повышение уровня ПСМА при перечисленных выше типах онкологии, как правило, предвещает более неблагоприятный прогноз и тяжёлое протекание болезни. В то же время ПСМА становится ещё одним маркером, к которому разработано большое количество конъюгатов для визуализации и лечения, что может помочь таким пациентам. На сегодняшний день попытки визуализации ПСМА при непростатическом раке были сделаны с применением радиофармацевтических конъюгатов, таких как [^{18}F]-DCFPyL, [^{68}Ga]-PSMA-NBED-CC, и др., в силу возможности применения ПЭТ/КТ [31, 32]. Но для гистологических исследований и интраоперационной хирургии здесь также более предпочтительны флуоресцентные конъюгаты, направленные на ПСМА.

Итак, конъюгаты с флуоресцентными красителями представляют собой большой пласт диагностических препаратов для визуализации

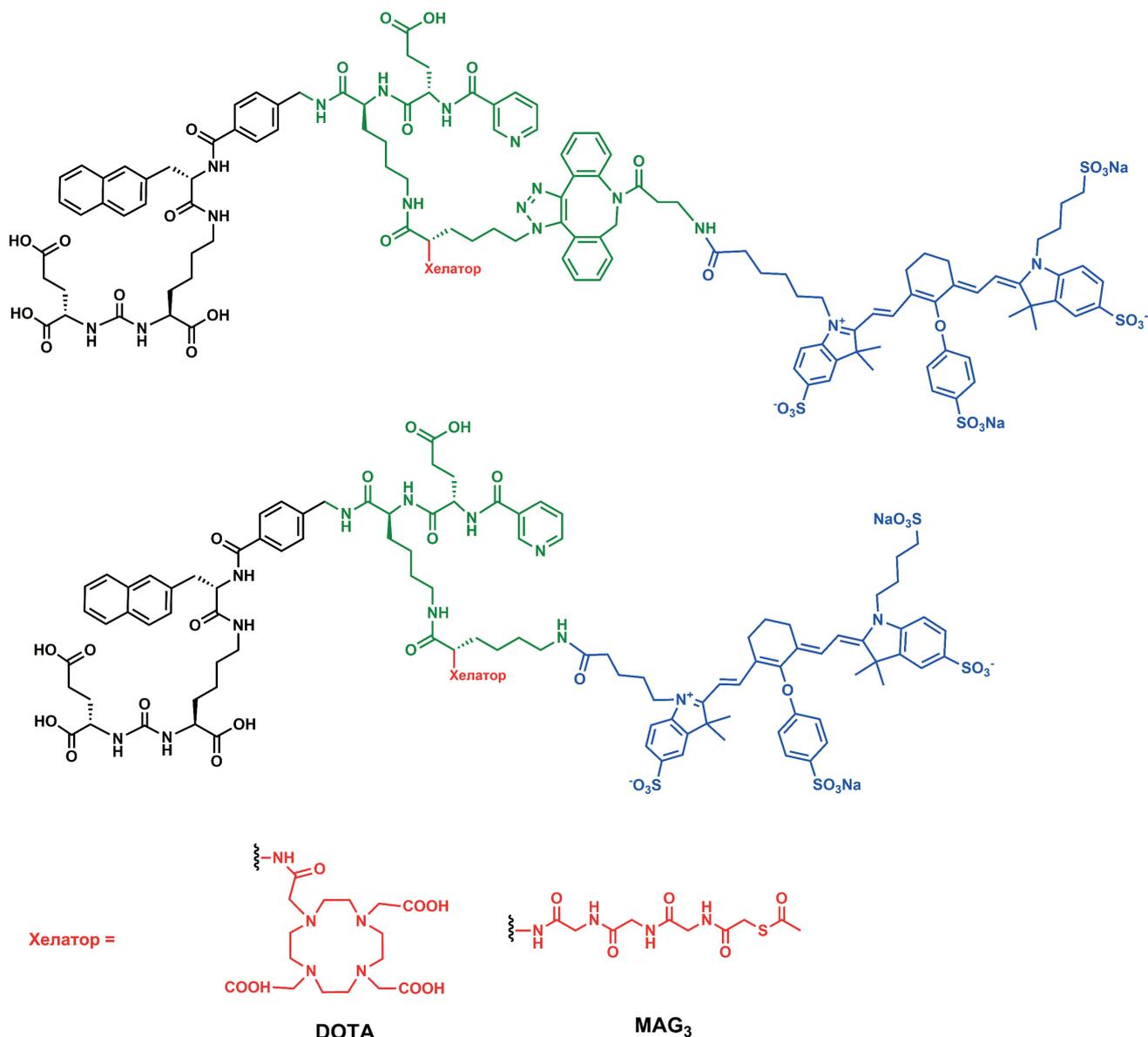


Рис. 7. Структуры разветвлённых двойных конъюгатов с флуоресцентной меткой IRDye800CW (синий) и хелатирующими агентами DOTA и MAG₃ (красный) на основе мочевины DCL (чёрный). Линкер выделен зелёным цветом

РПЖ и его метастазов. Они обладают преимуществами относительно радиофармацевтических препаратов, незатруднительны в синтетическом плане и являются перспективной альтернативой конъюгатам с радионуклидами. На что ещё стоит обратить внимание при выборе флуоресцентного красителя?

Помимо аффинности к белку-мишени лиганда-вектора, эффективность флуоресцентного конъюгата также определяется и другими физико-химическими показателями, например, квантовым выходом. Если данный параметр имеет высокое значение, то высокое накопление сигнала можно достичь не только за счёт связывания достаточного количества конъюгата с белком. В идеализированных условиях

значение квантового выхода должно стремиться к 1, однако данный параметр сильно зависит от множества факторов: растворителя, температуры, pH, структуры молекулы. Конверсия внутренних колебаний флуорофора зависит от структуры: чем жёстче структура, тем выше квантовый выход. В качестве примера можно привести пару флуоресцеина (квантовый выход равен 0,79) и фенолфталеина (квантовый выход равен 0,15), где структура первого соединения содержит на одну циклическую систему больше [33]. На другие факторы (температура, pH, растворители) в условиях биологических систем повлиять значительно труднее. Например, безызлучательные процессы можно снизить за счёт перехода на дейтерированные

растворители или увеличения их вязкости. Высокие квантовые выходы можно достичь при экстремально низких температурах, при которых уже не протекают биологические процессы. Также биологическая среда сильно ограничивает интервал допустимых значений pH. Таким образом, для увеличения показателей конъюгатов в плане квантового выхода и фотостабильности предпочтительнее брать флуоресцентные структуры с жёстким структурным скелетом, содержащим прочные связи и/или несколько циклических систем.

Несколько слов стоит сказать о двойных конъюгатах, которые позволяют объединить в одну молекулу несколько фрагментов, выполняющих разные функции. Использование конъюгатов двойного назначения в диагностике признано обеспечить как радио-, так и флуоресцентную визуализацию, что может быть очень полезным при таком методе терапии, как интраоперационная хирургия. Использование бимодальных конъюгатов позволяет проводить контроль опухоли на этапе диагностики, во время хирургического вмешательства, а также в постоперационный период. Применение в этом случае одного и того же диагностического селективного агента позволит уменьшить количество побочных эффектов, облегчить выбор врачом лекарственных препаратов для диагностики. Использование двойных конъюгатов с хелатирующим агентом и флуоресцентной меткой призвано помочь определить нахождение ПСМА-экспрессирующих тканей после [^{18}F]-ПЭТ.

Конструкция двойных конъюгатов, как правило, представлена двумя типами: разветвлённые, где сочленение происходит за счёт линкера с несколькими связующими участками, и последовательные, в которых один из функциональных фрагментов выступает в качестве элемента соединения для двух других, например, флуоресцентный краситель связан с векторной системой с одной стороны, а с другой – с биологически активной молекулой (например, хелатором). Как правило, такие конъюгаты представлены диагностическими агентами двух типов: направленные как на радиодетектирование, так и на флуоресцентное накопление [34]. Но встречаются сочетания флуоресцентного красителя и терапевтического препарата [11]. Флуоресцентный краситель в работе с диагностическими агентами двух типов представлен меткой IRDye800CW, хелатирование проводилось DOTA или меркаптоацетилтриглицином (MAG_3) (рис. 7).

Радиомечение полученных лигандов проводили ^{111}In для конъюгатов с хелатором DOTA

(радиоактивный выход составляет 93%) (N48 и N50) и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – для конъюгатов с хелатором MAG_3 (радиоактивный выход составляет 15–69%). Авторам удалось доказать стабильность полученных конъюгатов в сыворотке крови человека. Использование MAG_3 также приводит к увеличению липофильности, что может сказаться на поглощении, и существенно затрудняет синтез.

Наилучшую липофильность показали конъюгаты с дибензоциклооктеновой группой. Log D [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-N49 составил $-2,4$ по сравнению с $-3,5$ для его эквивалента на основе NHS $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N51 ($p < 0,01$). Log D [^{111}In]-N48 (SPAAC – реакция, промотируемая напряжением) составил $-3,2$ по сравнению с $-4,4$ для [^{111}In]-PSMA-N50 (NHS) ($p < 0,001$).

Исследование *in vitro* проводили на клеточных линиях LS174T-PSMA (PSMA +) и LS174T-WT (PSMA –). Все четыре лиганда показали специфическое связывание, доказанное экспериментом с предварительной блокировкой ПСМА с помощью избытка 2-PMPA. Однако накопление конъюгатов N48 и N49 (содержащих дибензоциклооктеновую группу) было весьма невысоким в сравнении с конъюгатами, полученными через NHS-эфир: $3,9 \pm 0,5\%$ – для [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-N49 и $8,9 \pm 0,6\%$ – для [^{111}In]-N48, по сравнению с NHS-конъюгированными вариантами; $22,9 \pm 1,6\%$ – для [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-N51 и $17,2 \pm 3,5\%$ – для [^{111}In]-N50. В качестве конъюгата сравнения был использован [^{111}In]-PSMA-617, накопление которого составило $13,4 \pm 3,5\%$. Но стоит отметить, что при этом для всех четырёх лигандов не наблюдалось неспецифического связывания. Тем не менее при конъюгировании с радиоактивной меткой стоит понимать, что свойства биологической активности могут поменяться. Более низкое сродство, чем у PSMA-617, авторы также связывают с более сложной структурой конъюгатов, которая приводит к большей интернализации, что, впрочем, может поспособствовать увеличению времени удержания конъюгатов.

Результаты исследования *in vivo* также показывают специфическое поглощение ПСМА-положительными клеточными линиями, сопоставимое с конъюгатами сравнения PSMA-617, PSMA-I&T и PSMA-1007, о которых сообщается в литературе. Поглощение вышеперечисленных молекул варьируются от 5 до 13% ID/g (LNCaP, $\frac{1}{2}$ часа после введения). Опухолевое поглощение N49 (9% ID/g) было в схожем интервале, а поглощение N48 (21% ID/g) было, возможно, даже выше (LS174T-PSMA, 2 часа после введения). Стоит отметить, что в данной работе авторы использовали клеточную линию

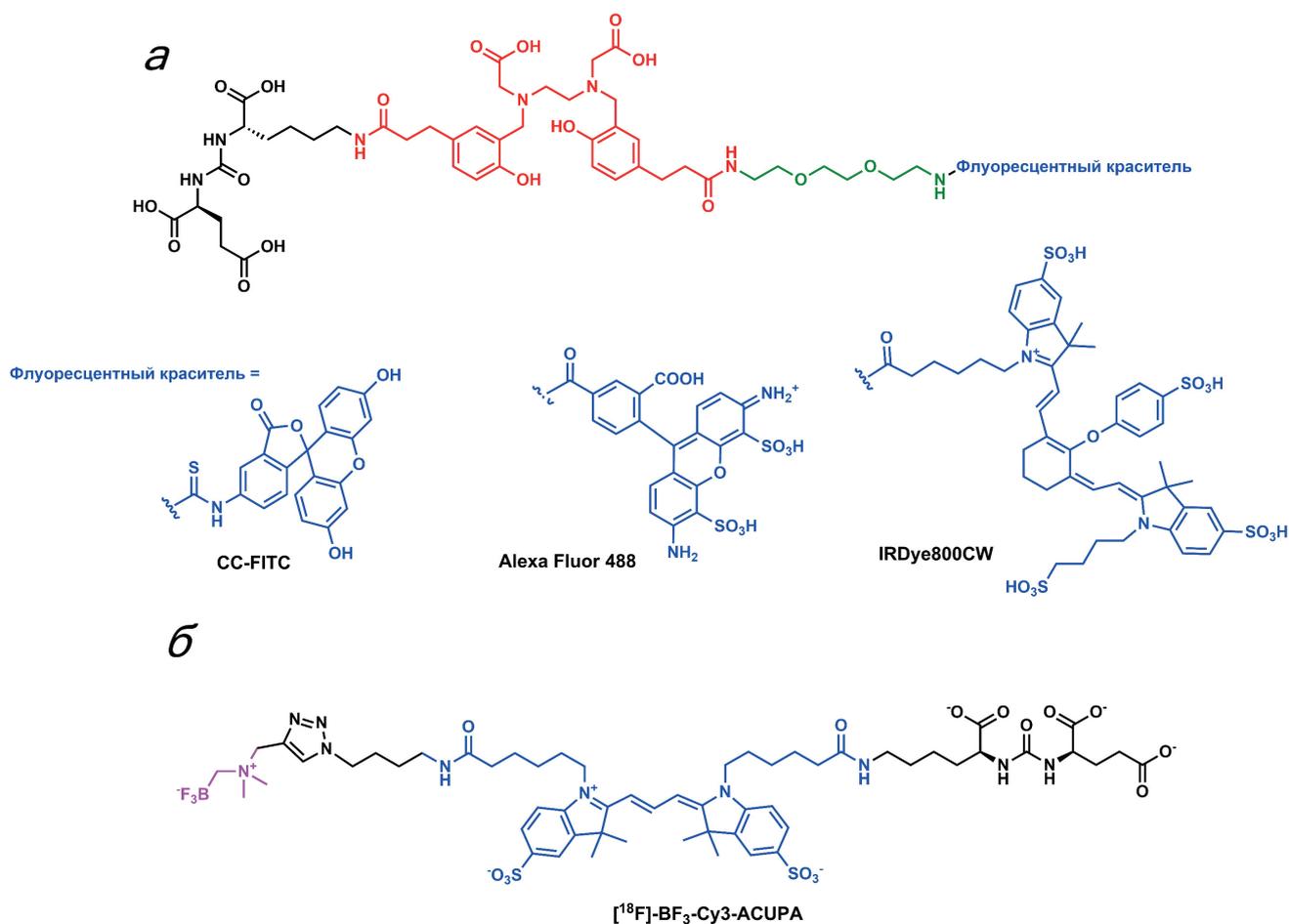


Рис. 8. Структуры последовательных конъюгатов: *а* – лиганд мочевины DCL (чёрный) связан с хелатирующим агентом HBED-CC (красный) и флуоресцентными метками FITC, Alexa Fluor 488, IRDye800CW, DyLight800 (синий); *б* – лиганд мочевины DCL (чёрный) связан с флуоресцентной меткой Cy3 (синий) и фторидной ловушкой (розовый). Линкер выделен зелёным цветом

LS174T-PSMA, в отличие от описанных ранее в литературе для PSMA-617, PSMA-I&T и PSMA-1007 LNCaP. Тем не менее прямое сравнение ксенотрансплантатов LNCaP и LS174T-PSMA не выявило существенных различий в поглощении трассера PSMA-I&T между этими моделями, что убедительно свидетельствует о том, что эффективность лигандов SPAAC находится в том же диапазоне, что и у клинически доступных лигандов.

Разветвлённые конъюгаты представляют собой стерически весьма сложные структуры, что ввиду строения активного центра ПСМА может снизить проникновение таких конъюгатов в клетку. В отличие от лекарственных препаратов, где закрытие той или иной функциональной группы может привести к полной потере противоопухолевой активности, хелатирующие и флуоресцентные агенты переносят модификации по свободным функциональным группам без значительных изменений спектральных свойств. Это открывает возможность для получения «линейных» конъюгатов,

в которых активные вещества последовательно соединены между собой. Опять же стоит отметить, что в данном случае флуоресцентная метка выступает ещё и в роли линкера, который может улучшать степень связывания конъюгата с ПСМА. Однако можно сделать и наоборот: поставить хелатирующий агент в середине конъюгата, при этом он должен быть стерически доступным для белка-мишени.

Примеры таких конъюгатов получены в работе Baranski et al. [35]. Лиганд-вектор в структуре представлен мочевиной DCL, далее в структуру введён хелатирующий агент HBED-CC. Присоединение происходит по карбоксильным группам со стороны ароматических колец. Далее идёт конъюгирование с флуоресцентными красителями различных типов: CC-FITC, Alexa Fluor 488, IRDye800CW (рис. 8, *а*). В качестве лиганда сравнения был взят PSMA-11. Мечение проводили ^{68}Ga , где радиоактивный выход для всех конъюгатов составил 99%.

Все конъюгаты показали сопоставимую аффинность с лигандом сравнения PSMA-11

в диапазоне 19–24 нМ. Это говорит о том, что хелатор HBED-CC не повышает аффинность конъюгата. Учитывая, что при мечении радионуклидом его структура претерпевает изменения и становится более объёмной, то, что аффинность не ухудшается относительно лиганда сравнения, является очень хорошим результатом. Мечение ^{68}Ga принципиально не повлияло на биологическую активность соединений. Селективность *in vitro* проверялась на клеточной линии LNCaP.

Высокое поглощение опухолью наблюдалось и на испытаниях *in vivo*. В сравнении с ранее полученным конъюгатом, более высокое поглощение показывают конъюгаты меченных ^{68}Ga с FITC ($10,86 \pm 0,94\%$ ID/g; фактор: 2,2; $p < 0,05$), IRDye800CW ($13,66 \pm 3,73\%$ ID/g; фактор: 2,8; $p < 0,05$) и DyLight800 ($15,62 \pm 5,52\%$ ID/g; фактор: 3,2; $p < 0,05$) против ^{68}Ga -PSMA-11 ($4,89 \pm 1,34\%$ ID/g). В то же время конъюгаты [^{68}Ga]-Glu-urea-Lys-HBED-CC-Alexa Fluor 488 показал аналогичное поглощение опухолью ($9,12 \pm 5,47\%$ ID/g; фактор: 1,9; $p > 0,05$). Выведение препаратов происходит через почки, также стандартно конъюгаты накапливались в экспрессирующей ПСМА селезёнке мышей. Благодаря своей флуоресценции в ближней инфракрасной области для дальнейшего применения лучше всего подходят [^{68}Ga]-Glu-urea-Lys-HBED-CC-IRDye800CW и [^{68}Ga]-Glu-urea-Lys-HBED-CC-DyLight800. Чуть лучшее соотношение опухоль–орган для соответствующих органов показывает конъюгат с флуоресцентной меткой IRDye800CW ([^{68}Ga]-Glu-urea-Lys-HBED-CC-IRDye800CW).

Исходя из исследования накопления сигнала установлено, что с течением времени наибольшее снижение уровня сигнала происходит через 2 часа после инъекции с дальнейшим сохранением этого уровня до 6 часов, что говорит о стабилизации поглощения конъюгата опухолью.

В другой работе были получены последовательные конъюгаты на основе мочевины DCL с флуоресцентными красителями Cu3 и с «фторидной ловушкой» (рис. 8, б) [36]. Присоединение проводилось через карбоксильные группы флуоресцентной метки Sulfo- Cu3 . Особенностью данной работы является то, что полученный конъюгат смог выйти на клинические испытания на людях [37, 38].

Исследования на клеточных линиях PC3-PIP (ПСМА +) и PC-3 (ПСМА –), проведённые Kommidı et al. [36], показали высокое сродство к простатическому специфическому мембранному антигену методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии.

Второй метод подтверждает мембранное накопление конъюгата во внеклеточном домене целевого белка. С помощью проточной цитофлуориметрии установлено сродство полученного конъюгата со значением $\text{EC}_{50} = 6,74 \pm 1,33$ нМ.

Исследования на ксенотрансплантатах мышей PC3-PIP и PC-3 в условиях *ex vivo* с помощью γ -сцинтилляционного счётчика подтвердили относительную селективность в опухолевой ткани и позволили качественно определить накопление в органах и тканях. Помимо этого, накопление и выведение вещества из организма происходит через почки, а также часть вещества остаётся в слюнных железах и проксимальном отделе тонкой кишки, что обусловлено наличием в их тканях ПСМА. Однако, несмотря на то что NAALADase I присутствует и в мозге, присутствия конъюгата там не обнаружено, что говорит о том, что соединение не способно проходить через гематоэнцефалический барьер. ПЭТ-детектирование флуоресценции также доказывает накопление сигнала в ПСМА-экспрессирующей клеточной линии PC3-PIP. Сигнал здесь в 5,2 раза выше, чем в ксенотрансплантате PC-3 (на предварительно вырезанной ткани). Устойчивое окрашивание наблюдается даже спустя 24 часа после инъекции.

Клинические испытания на людях проводились на группе мужчин 66 ± 7 лет. Введение препарата не вызвало побочных реакций со стороны нервной, пищеварительной, дыхательной и других систем. Селективное накопление в клетках РПЖ было продемонстрировано на разнообразной группе пациентов, включая пациентов с метастазами, различным уровнем ПСА в крови, различным баллом по шкале Глисона. [^{18}F]- BF_3 - Cu3 -ACUPA показал высокую чувствительность к тканям (ПСМА +) и позволил визуализировать как диссеминированный, так и локализованный рак. Отдельно стоит отметить сохранение флуоресцентного сигнала в течение 24 часов после инъекции, что является большим преимуществом [^{18}F]- BF_3 - Cu3 -ACUPA как диагностического агента. Благодаря этому пациент может прийти на ПЭТ-визуализацию, после чего без дополнительных инъекций получить возможность проведения интраоперационной флуоресцентной диагностики. Так как период полураспада ^{18}F составляет 108 минут, то к моменту операции уже не будет происходить ионизирующего излучения, а не связанный конъюгат выведется из крови и мочи.

Также стоит обратить внимание на работу Derks et al. [39], в которой представлены

двойные конъюгаты на основе мочевины, содержащие хелатор DOTA и сенсibilизатор IRDye700DX, о котором стоит сказать несколько слов. Данное соединение может выступать как в качестве флуоресцентной метки, так и в качестве фотосенсibilизатора. Фотодинамическая терапия предполагает селективное накопление сенсibilизатора в опухолевой ткани, после чего происходит его возбуждение пучком лазера, приближенного к максимальной длине поглощения красителя. Благодаря фотохимическим процессам происходит образование активных форм кислорода, вызывающих гибель клеток. Таким образом, несмотря на то что конъюгат является бимодальным, он при этом обладает тройным назначением. Хелатирование DOTAG в данной работе производилось ^{111}In и показало эффективную радиодиагностику. IRDye700DX, являясь фотосенсibilизатором, также обладает и спектральными характеристиками. Таким образом, конъюгаты могут выполнять как диагностическую, так и терапевтическую роль. Данная работа является продолжением более ранних работ научной группы Derks. Изначально ими была получена библиотека конъюгатов, где векторная молекула представляла собой мочевины DCL с присоединённым фрагментом аминокaproновой кислоты в качестве линкера. Далее производилось варьирование структуры линкера различными полипептидными фрагментами. В результате авторы статьи отмечают, что наилучшие результаты аффинности показывает конъюгат с пептидной последовательностью D-Phe-Glu-Glu, что хорошо согласуется с вышеприведённым нами аргументом о том, что аффинность конъюгатов может быть улучшена путём введения в структуру ароматических фрагментов и/или аминокислот, содержащих отрицательно заряженные группы. В следующей работе за основу были взяты уже зарекомендовавшие себя в исследованиях мочевины PSMA-1007 и PSMA-617. Также здесь можно проследить развитие модификации линкеров, которое подробно обсуждалось в нашем предыдущем обзоре [40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, на сегодняшний день флуоресцентные конъюгаты, направленные на простатический специфический мембранный антиген, представляют большой потенциал в области гистологических исследований и интраоперационной хирургии, а также в области фотодинамической терапии. Большое количество

исследований проведено с использованием «стандартных» флуоресцентных красителей: карбоцианинов, флуоресцеинов и др. На наш взгляд, стоит обратить внимание на достижения последних лет в области флуоресцентных молекул, меняющих свои физико-химические свойства в зависимости от окружающих их условий: молекулярные ротаторы, позволяющие значительно увеличить уровень сигнал/шум при визуализации; УФ-чувствительные метки, которые можно применять как индивидуально, так и в сочетании со стандартными флуоресцентными метками и хелатирующими агентами; фотосенсibilизаторы, некоторые из которых, как было описано выше, можно применять как в диагностических, так и в терапевтических целях.

Современные синтетические возможности позволяют эффективно оптимизировать время синтеза, затраты на реактивы и очистку соединений и др. Развитие твердофазных методов синтеза позволило значительно ускорить варьирование структур лигандов и установить основные закономерности в соотношении структура–активность. Благодаря этому установлено, что оптимальными векторными молекулами являются модифицированные мочевины на основе глутамата и лизина. Целесообразно между векторной молекулой и флуоресцентной меткой вводить отрицательно заряженные функциональные группы (лизин, глутаминовая кислота и др.) и ароматические системы (фрагменты фенилаланина, тирозина и др.). Стоит учитывать, что, если молекула флуорофора достаточно небольшая и имеет, например, достаточное количество сульфогрупп, она также может взаимодействовать с воронкообразным туннелем ПСМА и тем самым повышать сродство конъюгата. Также при выборе флуоресцентного красителя следует обращать внимание на такие параметры, как квантовый выход, водорастворимость, длины волн поглощения и испускания (для того чтобы попасть в окно прозрачности биологических тканей).

Возможно, в дальнейшем будут разработаны флуоресцентные камеры достаточной мощности, которые позволят визуализировать красители в тканях человека. Тогда мы сможем сократить облучение пациентов при использовании радиофармпрепаратов и применять его только в случае лечения. Причём, создавать терапевтические конъюгаты будет возможно на базе высокоселективных диагностических конъюгатов путём замены активного вещества. При создании новых молекул в первую очередь стоит ориентироваться на цель, которую закладывают в её разработку. Если целью

является получение гистологического препарата, то имеет смысл разрабатывать моноконъюгаты малых размеров, так как это сократит синтетическую схему и ускорит наработку таких веществ. Если речь о препарате для пациентов, то разработка многофункциональных соединений становится приоритетной, так как позволит снизить количество введений и дозировку. Таким образом, химиотерапия для диагностики (контрастные реагенты) становится более эффективной и безопасной.

Вклад авторов. Успенская А.А. — концепция, написание работы: оригинальный текст; Красников П.А. — оформление работы; Ма-

жуга А.Г. — руководство работой; Белоглазкина Е.К. — написание работы: рецензирование; Мачулкин А.Э. — концепция, написание работы: редактирование.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-23-00297, <https://rscf.ru/project/23-23-00297/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jones, A. D., and Wilton, J. C. (2017) Can intraoperative fluorescence play a significant role in hepatobiliary surgery? *Eur. J. Surg. Oncol.*, **43**, 1622-1627, doi: 10.1016/j.ejso.2017.02.015.
- Fei, X., and Gu, Y. (2009) Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe, *Prog. Nat. Sci.*, **19**, 1-7, doi: 10.1016/j.pnsc.2008.06.004.
- Hemmer, E., Benayas, A., Légaré, F., and Vetrone, F. (2016) Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm, *Nanoscale Horizons*, **1**, 168-184, doi: 10.1039/c5nh00073d.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., and Laversanne, M. (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.*, **71**, 209-249, doi: 10.3322/caac.21660.
- Jackson, P. F., Cole, D. C., Slusher, B. S., Stetz, S. L., Ross, L. E., Donzanti, B. F., and Trainor, D. A. (1996) Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated α -linked acidic dipeptidase, *J. Med. Chem.*, **39**, 619-622, doi: 10.1021/jm950801q.
- Kozela, E., Wrobel, M., Kos, T., Wojcikowski, J., Daniel, W. A., Wozniak, K. M., Slusher, B. S., and Popik, P. (2005) 2-MPPA, a selective glutamate carboxypeptidase II inhibitor, attenuates morphine tolerance but not dependence in C57/Bl mice, *Psychopharmacology (Berl)*, **183**, 275-284, doi: 10.1007/s00213-005-0182-5.
- Zhang, A. X., Murelli, R. P., Barinka, C., Michel, J., Cocleaza, A., Jorgensen, W. L., Lubkowski, J., and Spiegel, D. A. (2010) A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12711-12716, doi: 10.1021/ja104591m.
- Barinka, C., Novakova, Z., Hin, N., Bíme, D., Ferraris, D. V., Duvall, B., Kabarriti, G., Tsukamoto, R., Budesinsky, M., Motlova, L., Rojas, C., Slusher, B. S., Rokob, T. A., Rulíšek, L., and Tsukamoto, T. (2019) Structural and computational basis for potent inhibition of glutamate carboxypeptidase II by carbamate-based inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **27**, 255-264, doi: 10.1016/j.bmc.2018.11.022.
- Barinka, C., Rojas, C., Slusher, B., and Pomper, M. (2012) Glutamate carboxypeptidase II in diagnosis and treatment of neurologic disorders and prostate cancer, *Curr. Med. Chem.*, **19**, 856-870, doi: 10.2174/092986712799034888.
- Cilibrizzi, A., Wang, J. T.-W., Memdouh, S., Iacovone, A., McElroy, K., Jaffar, N., Young, J. D., Hider, R. C., Blower, P., Al-Jamal, K., and Abbate, V. (2022) PSMA-targeted NIR probes for image-guided detection of prostate cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **218**, 112734, doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.112734.
- Petrov, S. A., Machulkin, A. E., Uspenskaya, A. A., Zyk, N. Y., Nimenko, E. A., Garanina, A. S., Petrov, R. A., Polshakov, V. I., Grishin, Y. K., Roznyatovsky, V. A., Zyk, N. V., Majouga, A. G., and Beloglazkina, E. K. (2020) Polypeptide-based molecular platform and its docetaxel/sulfo-Cy5-containing conjugate for targeted delivery to prostate specific membrane antigen, *Molecules*, **25**, 5784, doi: 10.3390/molecules25245784.
- Liu, T., Jabbes, M., Nedrow-Byers, J. R., Wu, L. Y., Bryan, J. N., and Berkman, C. E. (2011) Detection of prostate-specific membrane antigen on HUVECs in response to breast tumor-conditioned medium, *Int. J. Oncol.*, **38**, 1349-1355, doi: 10.3892/ijo.2011.946.
- Humblet, V., Lapidus, R., Williams, L. R., Tsukamoto, T., Rojas, C., Majer, P., Hin, B., Ohnishi, S., De Grand, A. M., Zaheer, A., Renze, J. T., Nakayama, A., Slusher, B. S., and Frangioni, J. V. (2005) High-affinity near-infrared fluorescent

- small-molecule contrast agents for *in vivo* imaging of prostate-specific membrane antigen, *Mol. Imaging*, **4**, 448-462, doi: 10.2310/7290.2005.05163.
14. Jing, Y., Cai, M., Zhou, L., Jiang, J., Gao, J., and Wang, H. (2020) Application of an inhibitor-based probe to reveal the distribution of membrane PSMA in dSTORM imaging, *Chem. Commun.*, **56**, 13241-13244, doi: 10.1039/D0CC04889E.
 15. Matsuoka, D., Watanabe, H., Shimizu, Y., Kimura, H., Ono, M., and Saji, H. (2021) Synthesis and evaluation of a novel near-infrared fluorescent probe based on succinimidyl-Cys-C(O)-Glu that targets prostate-specific membrane antigen for optical imaging, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 4876-4880, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.09.037.
 16. Ye, S., Zhang, H., Fei, J., Wolstenholme, C. H., and Zhang, X. (2021) A general strategy to control viscosity sensitivity of molecular rotor-based fluorophores, *Angew. Chem. Int Ed.*, **60**, 1339-1346, doi: 10.1002/anie.202011108.
 17. Karimi, A., Börner, R., Mata, G., and Luedtke, N. W. (2020) A highly fluorescent nucleobase molecular rotor, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 14422-14426, doi: 10.1021/jacs.0c05180.
 18. Kopka, K., Benešová, M., Bařinka, C., Haberkorn, U., and Babich, J. (2017) Glu-ureido-based inhibitors of prostate-specific membrane antigen: Lessons learned during the development of a novel class of low-molecular-weight theranostic radiotracers, *J. Nucl. Med.*, **58**, 17S-26S, doi: 10.2967/jnumed.116.186775.
 19. Zhang, J., Rakhimbekova, A., Duan, X., Yin, Q., Foss, C. A., Fan, Y., Xu, Y., Li, X., Cai, X., Kutil, Z., Wang, P., Yang, Z., Zhang, N., Pomper, M. G., Wang, Y., Bařinka, C., and Yang, X. (2021) A prostate-specific membrane antigen activated molecular rotor for real-time fluorescence imaging, *Nat Commun.*, **12**, 5460, doi: 10.1038/s41467-021-25746-6.
 20. Lincoln, R., Bossi, M. L., Remmel, M., D'Este, E., Butkevich, A. N., and Hell, S. W. (2022) A general design of caging-group-free photoactivatable fluorophores for live-cell nanoscopy, *Nat. Chem.*, **14**, 1013-1020, doi: 10.1038/s41557-022-00995-0.
 21. Chen, Y., Dhara, S., Banerjee, S. R., Byun, Y., Pullambhatla, M., Mease, R. C., and Pomper, M. G. (2009) A low molecular weight PSMA-based fluorescent imaging agent for cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 624-629, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.017.
 22. Wang, X., Huang, S. S., Heston, W. D. W., Guo, H., Wang, B. C., and Basilion, J. P. (2014) Development of targeted near-infrared imaging agents for prostate cancer, *Mol. Cancer Ther.*, **13**, 2595-2606, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0422.
 23. Huang, S. S., Wang, X., Zhang, Y., Doke, A., Difilippo, F. P., and Heston, W. D. (2014) Improving the biodistribution of PSMA-targeting tracers with a highly negatively charged linker, *Prostate*, **74**, 702-713, doi: 10.1002/pros.22789.
 24. Tang, W., and Becker, M. L. (2014) "Click" reactions: a versatile toolbox for the synthesis of peptide-conjugates, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 7013-7039, doi: 10.1039/c4cs00139g
 25. Ciuk, A. K., and Lindhorst, T. K. (2015) Synthesis of carbohydrate-scaffolded thymine glycoconjugates to organize multivalency, *Beilstein J. Org. Chem.*, **11**, 668-674, doi: 10.3762/bjoc.11.75.
 26. Machulkin, A. E., Uspenskaya, A. A., Ber, A. P., Petrov, S. A., Saltykova, I. V., Ivanenkov, Y. A., Skvortsov, D. A., Erofeev, A. S., Gorelkin, P. V., Beloglazkina, E. K., Belov, E. I., Khazanova, E. S., and Majouga, A. G. (2019) Peptide agent comprising a urea derivative based PSMA-binding ligand, a method for preparing the same, and use for producing a conjugate with a drug and diagnostic agent, RF Patent 2697519.
 27. Machulkin, A. E., Shafikov, R. R., Uspenskaya, A. A., Petrov, S. A., Ber, A. P., Skvortsov, D. A., Nimenko, E. A., Zyk, N. U., Smirnova, G. B., Pokrovsky, V. S., Abakumov, M. A., Saltykova, I. V., Akhmirov, R. T., Garanina, A. S., Polshakov, V. I., Saveliev, O. Y., Ivanenkov, Y. A., Aladinskaya, A. V., Finko, A. V., Yamansarov, E. U., Krasnovskaya, O. O., Erofeev, A. S., Gorelkin, P. V., Dontsova, O. A., Beloglazkina, E. K., Zyk, N. V., Khazanova, E. S., and Majouga, A. G. (2021) Synthesis and biological evaluation of PSMA ligands with aromatic residues and fluorescent conjugates based on them, *J. Med. Chem.*, **64**, 4532-4552, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01935.
 28. Weissleder, R. (2001) A clearer vision for *in vivo* imaging: progress continues in the development of smaller, more penetrable probes for biological imaging, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 316-317, doi: 10.1038/86684.
 29. Kularatne, S. A., Thomas, M., Myers, C. H., Pravin, G., Kanduluru, A. K., Crihan, C. J., and Cichocki, B. N. (2019) Evaluation of novel prostate-specific membrane antigen-targeted near-infrared imaging agent for fluorescence-guided surgery of prostate cancer, *Clin. Cancer Res.*, **25**, 177-187, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0803.
 30. Kelderhouse, L. E., Chelvam, V., Wayua, C., Mahalingam, S., Poh, S., Kularatne, S. A., and Low, P. S. (2013) Development of tumor-targeted near infrared probes for fluorescence guided surgery, *Bioconjug. Chem.*, **24**, 1075-1080, doi: 10.1021/bc400131a.
 31. Raveenthiran, S., Esler, R., Yaxley, J., and Kyle, S. (2019) The use of ⁶⁸Ga-PET/CT PSMA in the staging of primary and suspected recurrent renal cell carcinoma, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **46**, 2280-2288, doi: 10.1007/s00259-019-04432-2.
 32. Salas Fragomeni, R. A., Amir, T., Sheikhabaei, S., Harvey, S. C., Javadi, M. S., Solnes, M. B., Kiess, A. P., Allaf, M. E., Pomper, M. G., Gorin, M. A., and Rowe, S. P. (2018) Imaging of nonprostate cancers using PSMA-targeted radiotracers: rationale, current

- state of the field, and a call to arms, *J. Nucl. Med.*, **59**, 871-877, doi: 10.2967/jnumed.117.203570.
33. Kellogg, R. E., and Bennett, R. G. (1964) Radiationless intermolecular energy transfer. III. Determination of phosphorescence efficiencies, *J. Chem. Phys.*, **41**, 3042-3045, doi: 10.1063/1.1725672.
 34. Derks, Y. H. W., Rijpkema, M., Amadjais-Groenen, H. I. V., Loeff, C. C., Roode, K. E., Kip, A., Laverman, P., Lüthe, S., Heskamp, S., and Löwik, D. W. P. M. (2022) Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition-based PSMA-targeting ligands for multimodal intraoperative tumor detection of prostate cancer, *Bioconj. Chem.*, **33**, 194-205, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00537.
 35. Baranski, A. C., Schäfer, M., Bauder-Wüst, U., Roscher, M., Schmidt, J., Stenau, E., Simpfendorfer, T., Teber, D., Maier-Hein, L., Hadaschik, B., Haberkorn, U., Eder, M., and Kopka, K. (2018) PSMA-11-derived dual-labeled PSMA inhibitors for preoperative PET imaging and precise fluorescence-guided surgery of prostate cancer, *J. Nucl. Med.*, **59**, 639-645, doi: 10.2967/jnumed.117.201293.
 36. Kommidi, H., Guo, H., Nurili, F., Vedvyas, Y., Jin, M. M., McClure, T. D., Ehdaie, B., Sayman, H. B., Akin, O., Aras, O., and Ting, R. (2018) ¹⁸F-Positron emitting/trimethine cyanine-fluorescent contrast for image-guided prostate cancer management, *J. Med. Chem.*, **61**, 4256-4262, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00240.
 37. Aras, O., Demirdag, C., Kommidi, H., Guo, H., Pavlova, I., Aygun, A., Karayel, E., Pehlivanoglu, H., Yeyin, N., Kyprianou, N., Chen, N., Harmsen, S., Sonmezoglu, K., Lundon, D. J., Oklu, R., Ting, R., Tewari, A., Akin, O., and Sayman, H. B. (2021) Small molecule, multimodal, [¹⁸F]-PET and fluorescence imaging agent targeting prostate-specific membrane antigen: first-in-human study, *Clin. Genitourin. Cancer*, **19**, 405-416, doi: 10.1016/j.clgc.2021.03.011.
 38. Aras, O., Demirdag, C., Kommidi, H., Pavlova, I., Boyko, V., Lundon, D. J., Ting, R., Tewari, A., Akin, O., and Sayman, H. B. (2021) Simultaneous injection of ¹⁸F-BF₃-Cy3-ACUPA and non-radioactive Cy7-ACUPA probes: a promising pre-biopsy PET and *ex vivo* fluorescence imaging approach to evaluate prostate cancer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **48**, 3732-3733, doi: 10.1007/s00259-021-05344-w.
 39. Derks, Y. H. W., van Lith, S. A. M., Amadjais-Groenen, H. I. V., Wouters, L. W. M., Kip, A., Franssen, G. M., Laverman, P., Löwik, D. W. P. M., Heskamp, S., and Rijpkema, M. (2022) Theranostic PSMA ligands with optimized backbones for intraoperative multimodal imaging and photodynamic therapy of prostate cancer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **49**, 2425-2435, doi: 10.1007/s00259-022-05685-0.
 40. Uspenskaya, A. A., Nimenko, E. A., Machulkin, A. E., Beloglazkina, E. K., and Majouga, A. G. (2021) The importance of linkers in the structure of PSMA ligands, *Curr. Med. Chem.*, **28**, 1-31, doi: 10.2174/0929867328666210804092200.

FLUORESCENT CONJUGATES BASED ON PROSTATIC SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN LIGANDS AS AN EFFECTIVE VISUALIZATION TOOL FOR PROSTATE CANCER

Review

A. A. Uspenskaia^{1*}, P. A. Krasnikov¹, A. G. Majouga^{1,2,3}, E. K. Beloglazkina¹, and A. E. Machulkin^{1,4}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia ; e-mail: uspenskaya.n@gmail.com

² National University of Science and Technology "MISiS", 119049 Moscow, Russia

³ Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Russia

⁴ RUDN University, 117198 Moscow, Russia

Fluorescent dyes are widely used in histological studies and in intraoperative surgery, including against prostate cancer (PC), which is one of the most common types of cancerous tumors among men today. Targeted delivery of fluorescent conjugates greatly improves diagnostic efficiency and allows for timely correct diagnosis. In the case of PC, the protein marker is prostate specific membrane antigen (PSMA). To date, a large number of diagnostic conjugates targeting PSMA have been created based on modified urea. The review focuses on narrowly targeted conjugates selectively binding to PSMA and answers the following questions. Which fluorescent dyes are already in use in the field of PC diagnosis? What factors influence the structure-activity ratio of the final molecule? What should be considered when selecting a fluorescent tag to create new diagnostic conjugates? And what can be offered in this field to date?

Keywords: prostate cancer, fluorescent dyes, prostate-specific membrane antigen, PSMA, targeted drug delivery