АСПЕКТИ НА ПРИЛОЖЕНИЕ НА RGD-ПЕПТИДИТЕ

Момчил Ламбев[1], Антония Христова[1], Димана Димитрова[1], Силвия Михайлова[1], Стефка Вълчева-Кузманова[2], Тамара Пайпанова[3]

[1]УС „Помощник-фармацевт", Медицински колеж– Варна, Медицински университет – Варна
[2]Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия, Факултет „Медицина", Медицински университет – Варна
[3]Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев", Българска академия на науките, София

ASPECTS OF THE USE OF RGD PEPTIDES

Momchil Lambev[1], Antonia Hristova[1], Dimana Dimitrova[1], Silvia Mihaylova[1], Stefka Valcheva-Kuzmanova[2], Tamara Pajpanova[3]

[1]TRS Assistant Pharmacist, Medical College, Medical University of Varna
[2]Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna
[3]Institute of Molecular Biology "Roumen Tsanev", Bulgarian Academy of Sciences, Sofia

РЕЗЮМЕ

Аминокиселинната последователност L-аргининил-глицил-L-аспарагинова киселина (L-argininyl-glycyl-L-aspatric acid) – RGD, е присъща на много екстрацелуларни и вътреклетъчни белтъци. Първоначално пептидът RGD е идентифициран във фибронектин през 1984 г. от E. Ruoslahti, който установява, че тези три аминокиселини са мястото за осъществяване на свързване (адхезия) на клетките към извънклетъчния матрикс или други клетки посредством клетъчни адхезивни молекули като интегрини. В последствие този три-аминокиселинен остатък е открит и в много други белтъци, намиращи се в екстрацелуларния матрикс и в кръвта. Той представлява общ мотив за разпознаване от някои рецептори на клетките. След откриването на RGD последователността като потенциален лиганд за свързване с клетъчните интегрини (най-често αvβ3) RGD-медиираните малки молекули и RGD-съдържащите терапевтични пептиди и белтъци се използват за контролирано лекарствено разпределение и като агенти за клетъчно прицелване и ендозомно доставяне. Поради големия брой интегрини в ендотелиалните клетки и кръвоснабдяването на туморните тъкани RGD-медиираното лекарствено доставяне

ABSTRACT

The amino acid sequence L-argininyl-glycyl-L-asparaginic acid (RGD) is inherent in many extracellular and intracellular proteins. Initially, the RGD peptide was identified in fibronectin in 1984 by E. Ruoslahti, who found that these three amino acids were the site of adhesion of cells to the extracellular matrix or other cells by cell adhesion molecules as integrins. Subsequently, this tri-amino acid residue was also found in many other proteins in the extracellular matrix and blood. It is a common pattern of recognition by some cell receptors. Following the discovery of the RGD sequence as a potential ligand for binding to cellular integrins (most commonly αvβ3), RGD-mediated small molecules and RGD-containing therapeutic peptides and proteins have been used for controlled drug distribution and as agents for cell targeting and endosomal delivery. Due to the large number of integrins in endothelial cells and blood vessels to tumor tissues, RGD-mediated drug delivery is of a particular interest in cancer therapy. Furthermore, the RGD-integrin system is used for target cell recognition and internalization, which is applied to human-created structures that mimic pathogens. Because of this, the systems are being tested for use as diagnostics, therapeutics, and regenerating transplanted tissues.

представлява специален интерес в противораковата терапия. Освен това RGD-интегриновата система се използва за прицелно клетъчно разпознаване и интернализация, което се прилага при създадени от човека структури, които имитират патогените. Поради това си свойство системите се изследват за приложение като диагностици, терапевтици и регенериращи трансплантираните тъкани.

Откриването на тумори се отличава с висока специфичност и чувствителност чрез конюгация на маркерите с RGD-пептиди. Тази важна технология се използва широко за ранна диагностика и диференциална диагноза на туморите, както и клиничен анализ и лечение. RGD модифицираните лекарства и агенти за образна диагностика се създават чрез конюгация на RGD-пептидите с носители. Молекулите носители биват натоварени с лекарствени молекули или молекули, генериращи сигнал. RGD-пептидите и RGD-миметиците се прилагат също и за модифициране на липозоми, полимери и пептиди по химичен начин, което повишава биологичните им ефекти като терапевтични агенти.

RGD-пептидите са перспективни молекули с голямо бъдещо приложение в терапията като лекарство-доставяща система, в образната диагностика и в тъканното инженерство.

Ключови думи: *RGD-пептиди, противоракова терапия, лекарствено доставяне, образна диагностика, тъканно инженерство*

The detection of tumors is characterized by high specificity and sensitivity by conjugation of markers with RGD peptides. This important technology is widely used for early diagnosis and differential diagnosis of tumors as well as for clinical analysis and treatment. RGD-modified drugs and imaging agents have been created by conjugation of RGD peptides to carriers. The carrier molecules are loaded with drug molecules or signal-generating molecules. RGD peptides and RGD mimetics are also applied to modify liposomes, polymers and peptides in a chemical way that increases their biological effects as therapeutic agents.

RGD peptides are promising molecules with great future use in therapy as a drug-delivery system, in imaging diagnostics and in tissue engineering.

Keywords: *RGD peptides. anticancer therapy. drug delivery. imaging diagnostics. tissue engineering*

ВЪВЕДЕНИЕ

Сред пептидното семейство, късоверижните пептиди представляват голям интерес за лекарственото разработване поради тяхното съотношение цена-ефективност, възможността за перорален прием и лесния начин за провеждане на молекулно структурни и количествени изследвания на активността (2,24).

Аргинин-глицин-аспарагинова киселина (RGD) е клетъчно прикрепващ се мотив, който се открива в много клетки от екстрацелуларния матрикс (ECM) и плазмени протеини (8). След като RGD са открити за първи път като специфично място за свързване на фибронектин (FN) и FN рецептор (21), те предизвикват голям интерес за изследвания. Много гликопротеини, като ламинин, витронектин (VN), фибриноген (Fg), фактор на фон Вилебранд, остеопонтин и т.н., са открити в ECM и те са протеини, към които се прикрепя RGD (17). RGD играе важна роля в клетъчното разпознаване и клетъчната адхезия, което се използва при туморната терапия и тъканното инженерство чрез рекомбинантни средства и някои химични методи (25).

Различни RGD-съдържащи пептиди се разработват за приложение като агенти за образна диагностика и лечение на тумори, лекарствено доставяне, прицелен трансфер на гени, биоматериали и тъканно инженерство. Значителен прогрес е постигнат в разработването на интегрин αvβ3-специфични линейни и циклични RGD-пептидни аналози като Cilengitide и c(RGDfK) за терапия на рак, както и за прицелно доставяне на агенти за образна диагностика. Някои модификации на RGD-пептидите, включително полимеризирани, свързвани с носители и замяна с пептидомиметици, биват разработвани, за да подобрят противотуморните свойства и да удължат времето за разграждане. RGD-пептиди, конюгирани с различни цитостатични агенти,

имат възможност да проявят противотуморен и антиангиогенен синергичен ефект. През последните години голям брой RGD-пептиди проявяват обещаваща активност *in vitro* и *in vivo* (2).

RGD пептидите притежават следните предимства: (i) RGD са с много по-малък размер в сравнение с моноклоналните антитела и RGD конюгатите могат лесно да достигнат до туморните тъкани; (ii) използването на RGD намалява риска от имунна реактивност или патогенен трансфер; (iii) синтезът на RGD пептидите е относително прост и евтин, което позволява навлизането му в клиниката (25).

ПРИЛОЖЕНИЕ НА RGD КАТО ЛЕКАРСТВО-ДОСТАВЯЩА СИСТЕМА

RGD-пептидът е включен в множество ключови биологични активности, свързани с клетъчната адхезия. Той медиира навлизането на протеини и вируси в прицелните клетки и има ключова роля в клетъчното прицелване и групирането на мембранните рецептори при Т-лимфоцитите. RGD-съдържащите пептиди показват независим от закрепването апоптотичен ефект, при лимфоцити и кардиомиоцити. При тези клетки активирането на каспаза 3, последвано от директно взаимодействие с RGD-съдържащите пептиди, показва способността на RGD да навлиза в клетките и да действа вътреклетъчно (1).

RGD-базираните лиганди за интегрини са изследвани в патологията и фармакологията. Освен това RGD-интегриновата система е използвана за прицелване на клетъчно разпознаване и интернализация, което се прилага при създадени от човека конструкции за имитиране на патогени. Тази система позволява изследването на много аспекти (като диагностици, терапевтици и за регенериране на трансплантирани тъкани). RGD модифицираните лекарства и агенти за образна диагностика са изследвани и разработвани чрез конюгация на RGD с носител. Носителят може да бъде снабден с лекарствена молекула или вещество за диагностика. RGD-пептидите и RGD-миметиците се прилагат също за модифициране на липозоми, полимери и пептиди по химически начин, за да подобрят биологичните ефекти на терапевтичните агенти. Освен това те са включени в генната терапия чрез вирусни и невирусни вектори (23). Клетъчно повърхностната технология с подобрени RGD-пептиди популяризира приложението на интегрин-медиираната клетъчна адхезия за развитие на тъканно инженерство, по-специално за биоматериали (25).

Наноносители като липозоми, наночастици, мицели и др. могат да бъдат свързани с насочващ остатък, какъвто е RGD. Тези наноносители притежават някои предимства: (i) техният размер (20-400 nm), което води до „пасивното прицелване“ в туморите, което също се нарича и ефект на повишено премиване и задържане (EPR) (18); (ii) поради размера на тези системи бъбречната филтрация се избягва, което води до удължено време на престой в кръвотока и по-дълъг достъп на лигандите до прицелните рецептори в тъканите (19); (iii) RGD-наноносителите могат да насочат специфично лекарствата към ангиогенните ендотелни клетки и/или раковите клетки чрез свързването на RGD пептидите към αvβ3 интегрините, свръхекспресирани на тези клетки, което позволява „активното прицелване“ на тези тумори (6); (iv) RGD прицелените наноносители могат да бъдат интернализирани чрез рецептор-медиирана ендоцитоза, което не е възможно с единична пептидна конструкция или с неприцелени наноносители, което е от особено значение за вътреклетъчното доставяне на лекарствата до раковите клетки (23).

RGD-прицелните наноносители доказват предимства в доставянето на химиотерапевтици, пептиди и протеини, нуклеинови киселини и ирадиация. Основната причина зад разработването на RGD-прицелните наноносители е доставянето на различни фармакологични агенти до αvβ3 експресираните туморни кръвоносни съдове. Цитотоксичното лекарство разрушава туморните съдове, което дава резултат в индиректно унищожаване на туморните клетки, индуцирано от недостига на кислород и хранителни вещества. Растежът на тумора може да бъде предотвратен чрез избягване на образуването на нови кръвоносни съдове в тумора (12).

RGD пептидите са ефективен лиганд за туморно прицелване, след като се показва, че интегрините са свръхекспресирани не само върху туморния ендотелиум, но също и върху туморните клетки при много от раковите клетъчни линии (11,28). По тази причина наноносители, свързани с RGD пептид, могат да се смятат за двойно насочени системи. Други широко описвани лиганди като фолат или трансферин са експресирани единствено върху раковите клетки. Освен това αvβ3 интегрините са слабо екпресирани върху ендотелиални клетки, при които няма активна ангиогенеза. От друга страна трансферинът е експресиран в по-високи нива при ракови клетки, но също и при мозъчните капиляри, ендокринните клетки на панкреаса и Купферо-

вите клетки на черния дроб (10). В допълнение, някои лиганди като фолат, който присъства и в храната, показва естествено високи концентрации в човешкото тяло и може да се конкурира с наночастиците, свързани с лиганд, за свързването към рецептора, което намалява вътреклетъчна концентрация на доставеното лекарство (20). Главното предимство на RGD наноносителите е по-точно възможността за двойно прицелване. Първо, ендотелните клетки се прицелват поради експресията на αvβ3 интегрините и раковите клетки (при които също са експресирани тези интегрини) са също прицелени след екстравазацията на наноносители. Второ, потенциалното нормализиране, което дава резултат в антиангиогенни свойства (RGD прицелването и присъщите свойства на някои противоракови лекарства) на наноносителите може да подобри доставянето на лекарства в тумори (5,9).

ПРИЛОЖЕНИЕ НА RGD В ОБРАЗНАТА ДИАГНОСТИКА

Молекулярното изображение за неинвазивното измерване на ангиогенезата представлява особен интерес за клиницистите, след като антиангиогенните лекарства се използват успешно при пациенти с рак. Най-често използваните техники са позитронно-емисионнната томография (PET), компютърната томография (single photon emission computed tomography – SPECT), ядрено-магнитният резонанс (ЯМР) и различни оптични техники за изобразяване с висока чувствителност. Голям интерес привлича откриването и разработването на биомаркери за ранен туморен отговор. Един обещаващ подход е да се идентифицират молекулните маркери на ангиогенезата чрез конюгиране на специфичен лиганд, разпознаващ свръхекспресираните рецептори при ангиогенните тумори (3). В тази област една от най-обещаващите и изучени мишени са αvβ3 интегрините (9,26).

Образната диагностика при туморите има висока специфичност и чувствителност чрез конюгацията на образните агенти с RGD-пептиди. Тази важна технология се използва за ранна и диференциална диагностика на тумори, както и при клиничните анализи и лечение. RGD притежават сравнително висок и специфичен афинитет към αvβ3 интегрините, свръхекспресирани в туморните кръвоносни съдове. Прицелените в интегрините радиоактивни изотопи биват лесно визуализирани. RGD-пептидът (прицелващата биомолекула) служи като преносител на радионуклида до свръхекспресираните интегрини. С помощта на RGD се постига напредък в почти всички методи за образна диагностика (SPECT, PET, ЯМР) (15).

РАЗВИТИЕ НА ТЪКАННОТО ИНЖЕНЕРСТВО С ПОМОЩТА НА RGD-ПЕПТИДИТЕ

Тъканното инженерство е нова дисциплина, която се развива през последните години. При нея биологични субституенти се използват за поправка, поддържане или подобряване на функцията на биологични тъкани, чрез приложението на принципите на биологията и инженерството. Важна концепция в тъканното инженерство е, че имплантираният субстрат трябва не само да осигурява структурна поддръжка на увредените тъкани, но също и да се интегрира с тези тъкани и да повишава регенерацията в обкръжаващите области. RGD ефективно подпомага прикрепването на различни видове клетки към изобилие от различни материали (4).

Интегрините могат да разпознаят и да взаимодействат с RGD-последователността и активността на RGD-пептидите може да се задържи по време на процесите на обработка и стерилизация. Модифицирането с определени RGD-пептиди върху повърхността на биоматериала подпомага приложението при интегрин-медиираната клетъчна адхезия, което насърчава развитието на тъканното инженерство. Интегрините могат да контролират клетъчната адхезия към повърхността на биоматериалите чрез взаимодействие с адхезивни екстрацелуларни лиганди (13).

Michal et al. демонстрират, че RGD-имобилизирани алгинатни остатъци са подходящи за сърдечно тъканно инженерство, защото имобилизираните RGD-пептиди подобряват клетъчното придържане към матрикса, предотвратяват клетъчната апоптоза, повишават клетъчното оцеляване и възстановяване и освен това забързват регенерацията на сърдечната тъкан (22).

RGD-базираните лиганди на интегрините действат като точки за прикрепване, тъй като актиновият цитоскелет може да се свърже с тези точки и да образува структурни компоненти на клетките. Екстрацелуларните адхезивни белтъци, особено RGD, подобряват клетъчната адхезия и миграция, което играе особено важна роля в осеоинтеграционното поведение на остеобластите. Подобрената осеоинтеграция, изследвана при RGD-покритите повърхности, стимулира последните усилия за прикрепване на RGD към метали, покрити с оксиди и техните сплави, като титан (Ti) и неговата сплав – Ti-6A1-4V. Chen et al. изследват комбинираните ефекти на лазерното микроуплътняване и RGD-покриването върху осеоинтеграция на Ti-6A1-4V игли *in vivo*. Ре-

зултатите показват, че имобилизирането на RGD върху титаниевата повърхност подобрява лекуването с имплантирана кост чрез подобряване на ранното прикрепване на остеобласти и последващата диференциация чрез улесняване на интегриновото свързване (7).

Интегритетът на корнеята е критичен за нашите очи. Корнеята може да се повреди, когато корнеалните ендотелни клетки намалеят с годините или след заболяване (16). Разработките в тъканното инженерство имат потенциала да поправят корнеалните увреждания. RGD-медиираните повърхностни модификации улесняват клетъчното прикрепване, пролиферация, подредба и експресия както на колагени (тип I и V) и протеогликани (декорин и бигликан). Gil и сътр. демонстрират чрез RGD-свързаната коприна човешка корнея може да бъде биофункционализирана, което се постига чрез интегриране на тъкан от корнеалната строма с богат на протеогликани екстрацелуларен матрикс. Този биомиметичен подход за репликиране на структурната йерархия и архитектура на тъканите в корнеалната строма може да бъде полезна стратегия за поправка на корнеята. Освен това този подход може да се използва и при поправката на други тъканни системи (14).

Търсенето на съдови присадки с малък диаметър за нуждите на сърдечно-съдовите заболявания е нарастващ, затова е нужно и разработване на субституенти с биофункционалности. RGD-модифицираните присадки инхибират тромбоцитната агрегация, вследствие на което се повишава клетъчната инфилтрация, образуването на ендотелни клетки и регенерацията на гладката мускулатура на кръвоносните съдове (25,27).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение, RGD-пептидната последователност, както и специфичното място на разпознаване на взаимодействие между интегрини и техните лиганди, имат голям потенциал за приложение в раковата терапия, образната диагностика и тъканното инженерство.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aguzzi MS, Giampietri C, De Marchis F, Padula F, Gaeta R, Ragone G, Capogrossi M and Facchiano A. RGDS peptide induces caspase 8 and caspase 9 activation in human endothelial cells. Blood 2004;103:4180-4187.
2. Balacheva A, Iliev I, Detcheva R, Dzimbova T, Pajpanova T, Golovinsky E. In vitro assessment of the cytotoxic effects of novel RGD analogues. BioDiscovery 2012 4(1)
3. Beer AJ, Schwaiger M. Imaging of integrin alpha v beta3 expression. Cancer Metastasis Rev. 2008;27:631-644.
4. Bellis SL. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. Biomaterials 2011;32:4205-4210.
5. Bouzin C, Feron O. Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery. Drug Resist. Updates 2007;10:109–120.
6. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. Adv. Drug Delivery Rev. 2008;60:1615–1626.
7. Chen J, Bly R, Saad, M, AlKhodary M, El-Backly R, Cohen D, Kattamis N, Fatta M, Moore W, Arnold C. In vivo study of adhesion and bone growth around implanted laser groove/RGD-functionalized Ti-6Al-4V pins in rabbit femurs. Mat.Sci.Eng. C 2011;31:826–832.
8. Colombo M, Bianchi A. Click chemistry for the synthesis of RGD-containing integrin ligands. Molecules 2010;15:178–197
9. Danhier F, Le Breton A, and Preat V. RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. Mol. Pharmaceutics 2012;9:2961–2973
10. Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. Clin. Immunol. 2006;121(2):159–176.
11. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. Nat. Rev. Cancer 2010;10:9–22.
12. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J. Med. 1971;285:1182–1186.
13. García AJ. Get a grip: Integrins in cell-biomaterial interactions. Biomaterials 2005;26:7525–7529.
14. Gil ES, Mandal BB, Park SH, Marchant JK, Omenetto FG, Kaplan DL. Helicoidal multi-lamellar features of RGD-functionalized silk

biomaterials for corneal tissue engineering. Biomaterials 2010;31:8953–8963.

15. Haubner R, Wester HJ. Radiolabeled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies. Curr. Pharm. Design. 2004;10:1439–1455.

16. Jo DH, Lee TG, Kim JH. Nanotechnology and nanotoxicology in retinopathy. Int. J. Mol. Sci. 2011;12:8288–8301

17. Kim J, Nam HY, Kim TI, Kim PH, Ryu J, Yun CO, Kim SW. Active targeting of RGD-conjugated bioreducible polymer for delivery of oncolytic adenovirus expressing shRNA against IL-8 mRNA. Biomaterials 2011;32:5158–5166.

18. Maeda H, Sawa T, Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. J. Controlled Release 2001;74:47–61.

19. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. Trends Pharmacol. Sci. 2009;30:592–599.

20. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discovery Today 2010;15:842–850.

21. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 1984;309:30–33.

22. Shachar M, Tsur-Gang O, Dvir T, Leor J, Cohen S. The effect of immobilized RGD peptide in alginate scaffolds on cardiac tissue engineering. Acta Biomater. 2011;7:152–162.

23. Temming K, Schiffelers RM, Molema G, Kok RJ. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. Drug Resist. Update 2005;8:381–402.

24. Ung P, Winkler DA. Tripeptide Motifs in Biology: Targets for Peptidomimetic Design J Med Chem 2011;54:1111–1125

25. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S and Xie T. The Functions and Applications of RGD in Tumor Therapy and Tissue Engineering. Int. J. Mol. Sci. 2013;14:13447-13462

26. Ye Y, Chen X. Integrin targeting for tumor optical imaging. Theranostics 2011;1:103–125.

27. Zheng W, Wang Z, Song L, Zhao Q, Zhang J, Li D, Wang S, Han J, Zheng XL, Yang Z. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model. Biomaterials 2012;33:2880–2891.

28. Zitzmann S, Ehemann V, Schwab M. Arginine-glycineaspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumorendothelial cells in vivo. Cancer Res. 2002;62:5139–5143

Адрес за кореспонденция:
Момчил Ламбев
Медицински колеж,
Медицински университет – Варна
бул. „Цар Освободител“ 84
Варна 9000
e-mail: momchil.lambev@mu-varna.bg