

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ГАСТРИНА

Л.П. Сушинина, А.П. Смирнова, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, Т.А. Сидорова, М.П. Киселева, Л.М. Борисова, З.С. Шпрах

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Людмила Ивановна Смирнова chemlab@ronc.ru

Введение. Работа посвящена поиску новых соединений с высокой избирательностью противоопухолевого действия на опухоли желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в ряду аналогов пептидного гормона гастрин.

Цель исследования – синтез 2 аналогов гастрин, 1 из которых содержит цитотоксическую группу; изучение их цитотоксической и противоопухолевой активности.

Материалы и методы. Синтез пептидов осуществляли классическими методами пептидной химии. Цитотоксическую активность изучали на культуре клеток линии НСТ116. Противоопухолевую активность аналогов гастрин оценивали на моделях перевиваемых опухолей мышей: аденокарциноме тонкой кишки АКАТОН и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ.

Результаты. Синтезированы 2 аналога гастрин (октапептиды), 1 из которых содержит цитотоксическую группу. Обнаружена цитотоксическая активность аналога гастрин, в химической структуре которого присутствует цитотоксическая группа. Изучена противоопухолевая активность 2 аналогов гастрин на перевиваемых опухолях ЖКТ мышей: АКАТОЛ и АКАТОН. Установлена противоопухолевая активность цитотоксического и нецитотоксического аналогов гастрин на аденокарциноме тонкой кишки АКАТОН: 74 и 84 % торможения роста опухоли соответственно. На аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ исследованные аналоги гастрин противоопухолевого действия не показали.

Выводы. Терапевтический эффект 2 аналогов гастрин на аденокарциноме тонкой кишки АКАТОН, вероятно, связан с экспрессией рецепторов гастрин ССК2 в этой опухоли.

Ключевые слова: аналоги гастрин, синтетические пептиды, цитотоксическая активность, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-63-68

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF MODIFIED GASTRIN FRAGMENTS

L.P. Sushinina, A.P. Smirnova, S.V. Ustinkina, L.I. Smirnova, T.A. Sidorova, M.P. Kiseleva, L.M. Borisova, Z.S. Shprakh

N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. The purpose of this investigation is the search of new compounds with high selectivity of antitumor action on the tumor of the gastrointestinal tract (GIT) in the series of analogues of the peptide hormone gastrin.

Objective: synthesis of 2 analogues of gastrin, 1 of which contains the cytotoxic group, the study of their cytotoxic and antitumor activity.

Materials and methods. Synthesis of peptides was carried out by classical methods of peptide chemistry. Cytotoxic activity was studied on the cell culture HCT116. Antitumor activity of analogues of gastrin were studied on transplanted tumors of the GIT of mice AKATOL and AKATON.

Results. Two analogues of gastrin (octapeptide) were synthesized, 1 of which contains a cytotoxic group. Analogue containing cytotoxic group revealed the cytotoxic activity. Antitumor activity of two analogues of gastrin were studied on transplanted tumors of the GIT of mice AKATOL and AKATON. The cytotoxic and non-cytotoxic analogues of gastrin showed antitumor activity only on AKATON. Inhibition of tumor growth is 74 and 84 %, respectively.

Conclusions. The therapeutic effect of two analogues of gastrin on adenocarcinoma AKATON, probably, is associated with the expression of gastrin receptors CCK2 in this tumor.

Key words: gastrin analogues, synthetic peptides, cytotoxic activity, antitumor activity

Введение

Работа направлена на поиск новых соединений в ряду аналогов пептидного гормона гастрин с высокой избирательностью противоопухолевого дей-

ствия на опухоли желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Актуальность поиска определяется отсутствием в клинической практике препаратов с избирательным

действием на опухоли ЖКТ, плохо поддающиеся лекарственной терапии. Открытие рецепторов гастринина в опухолях ЖКТ также оправдывает направление поиска.

Биологические эффекты гастринина реализуются через 2 типа рецепторов, принадлежащих к семейству холецистокининовых рецепторов: ССК1 и ССК2, которые идентифицированы и клонированы [1, 2]. Рецептор ССК2 взаимодействует с фрагментами гастринина, чем и обусловлен биологический эффект С-концевых коротких фрагментов гастринина [3].

Данные о том, что гастрин и его аналоги стимулируют рост нормальных и опухолевых клеток, привели к исследованию его роли в развитии опухолей [4, 5]. Были синтезированы модифицированные С-концевые аналоги гастринина, способные подавлять индуцированную нативным гастринином секрецию соляной кислоты и проявлять свойства антагонистов гастринина [6, 7]. Некоторые антагонисты гастринина были использованы при лечении рака желудка [7]. Этот эффект также реализовывался через рецепторы ССК2.

Возможно, что высокие избирательность и сродство, характеризующие взаимодействие полипептидного гормона с его рецептором, могут быть использованы при разработке противоопухолевых лекарств при условии, что опухоли-мишени содержат рецепторы этого гормона. При этом цитотоксические агенты могут конъюгироваться с пептидом. Этот подход был использован для получения цитотоксических аналогов пептидных гормонов люлиберина и соматостатина [8].

Адресная доставка цитотоксических агентов к опухолям и метастазам при помощи различных носителей позволяет увеличивать их дозу, снижать токсичность и улучшать результаты лечения [9].

Нативный гастринин имеет в своем составе 17 аминокислот:

1 2 3 4 5 6–10 11 12 13 14 15 16 17
 Pyl-Gly-Pro-Trp-Met-(Glu)5-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Наименьшим фрагментом, сохраняющим специфическую активность молекулы гастринина, является С-концевой тетрапептид с последовательностью 14–17. Сродство к рецепторам аналогов гастринина увеличивается по мере удлинения аминокислотной последовательности. Мы остановили свой выбор на последовательности гастринина 10–17 с целью ее модификации и дальнейшего использования в качестве носителя цитотоксической группы.

Нативные фрагменты С-концевого гастринина модифицировали следующим образом: Met15 заменили на Leu15 для предотвращения окисления, а Gly13 на Pro13 для стабилизации конформации, которая предпочтительна для рецепторов ССК2, так как ра-

нее продемонстрировано, что такое замещение увеличивает биологическую активность [10, 11]. С-концевой фенилаланин оставили без замены, так как показана необходимость его наличия в структуре лиганда для связывания с рецепторами ССК2 человека [12].

В качестве цитотоксического агента использовали п-ди (2-хлорэтил) аминифенилуксусную кислоту (ClPhe). Цитотоксическая группа алкилирующего типа п-ди (2-хлорэтиламин) была использована при создании высокоактивных противоопухолевых препаратов сарколизин и цифелин [13, 14].

Цитотоксические агенты в силу их гидролитической неустойчивости включали на последней стадии синтеза на N-конце, где они не предотвращают взаимодействие пептидного носителя с рецептором мишени.

Синтезированные аналоги гастринина, 1 из которых содержит цитотоксическую группу, исследованы на цитотоксическую и противоопухолевую активности.

Материалы и методы

Синтез. Синтез пептидов осуществляли классическими методами пептидной химии в условиях, сводящих возможность рацемизации отдельных аминокислот к минимуму. Ключевые стадии стыковки фрагментов осуществляли азидным методом. При синтезе фрагментов использовали метод смешанных ангидридов и метод активированных эфиров.

Выбор защитных групп определялся требованием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении N^α-защитных группировок на промежуточных стадиях синтеза.

Для защиты α-аминогрупп на всех стадиях синтеза применяли трет-бутилоксикарбонильную группу (Boc). Карбоксильные группы С-концевых аминокислотных остатков фрагментов (11–13) защищали этерификацией (метилловые эфиры). Для защиты реакционноспособных групп в боковых цепях трифункциональных аминокислот использовали бензильную защиту (Bzl) гидроксильной группы в остатке Tyr12 и b-карбоксила в остатке Asp16.

Для удаления бензильных защитных групп боковых цепей тирозина и аспарагиновой кислоты использовали метод каталитического гидрогенолиза в присутствии палладиевой черни. Трет-бутилоксикарбонильную группу удаляли ацидолизом [14].

Для очистки и выделения защищенных пептидов использовали колоночную хроматографию на силикагеле.

Для тонкослойной хроматографии пептидов применяли пластинки с тонким слоем силикагеля, используя следующие системы растворителей: хлороформ–метанол (5:2); n-бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:1).

Температуру плавления определяли на анализаторе температуры плавления с цифровым термометром (Sanyo Gallenkamp, Япония).

Удельное вращение измеряли на поляриметре Unipol L (Schmidt + Haensch, Германия).

Чистоту полученных соединений и содержание примесей определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Shimadzu. Колонка: Reprosil-Pur Basic C18, 5 мкм, 250 × 4,6 мм. Условия: линейный градиент АВ – 5 % В (0 мин) – 100 % В (20 мин). А – 0,01 % трифторуксусная кислота в воде, В – 0,01 % трифторуксусная кислота в ацетонитриле.

Цитотоксическая активность. Вещества растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (100 %), концентрация веществ в исходных растворах была 5×10^{-33} М.

Для тестирования цитотоксической активности использовали культуру клеток аденокарциномы кишечника человека линии НСТ116, в которых, согласно данным литературы, экспрессируются рецепторы гастринина. Для определения цитотоксической активности исследуемых веществ использовали МТТ-тест. В качестве количественного критерия цитотоксичности тестируемых препаратов был использован индекс IC_{50} – концентрация соединений, вызывающая гибель 50 % клеток в течение 72–96 ч инкубации. За 100 % принимали выживаемость клеток, инкубированных без препаратов (контроль).

Противоопухолевая активность. Исследование противоопухолевой активности аналогов гастринина проводили на мышах-самках линии BALB/c массой 18–20 г, полученных из разведения экспериментально-биологической лаборатории (вивария) НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества о состоянии здоровья.

Мышей содержали в специальных просторных клетках по 5 особей при температуре воздуха 20–23 °С и относительной влажности 60–65 % в условиях естественного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, стерилизованных в сухожаровом шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный и сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Кормление проводили в одно и то же время. Сырую питьевую воду, помещенную в закрытые поилки, мыши получали в неограниченном количестве. Для питья использовали поилки на 250 мл с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре.

Перед лечением мышей распределяли по группам. Число животных в контрольной группе составляло 10, в опытных группах было по 8 мышей. Наблюдение за животными проводили до их гибели.

Оценку противоопухолевой активности синтезированных аналогов гастринина проводили на моделях перевиваемых опухолей мышей: аденокарциноме тонкой кишки АКАТОН и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ. Опухоль АКАТОЛ выбрана в качестве модели сравнения, так как предполагается, что в этой опухоли рецепторы гастринина ССК2, через которые работают аналоги гастринина, недостаточно или они отсутствуют. Известно, что рецепторы к гастрину имеются в тонкой кишке и поджелудочной железе [15].

АКАТОЛ и АКАТОН трансплантировали животным подкожно по стандартной методике. При перевивке опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл полученной суспензии (около 50 мг опухолевых клеток) вводили подкожно в область правой подмышечной впадины. Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухоли [16, 17].

ПГ-132 и ПГ-131 растворяли в ДМСО и разводили физиологическим раствором до 10 % концентрации ДМСО.

Синтезированные аналоги гастринина изучали при ежедневном подкожном введении в течение 5 дней. Аналог ПГ-132, содержащий цитотоксическую группу (хлорфенацил), исследовали в дозах 5, 10 и 20 мг/кг. Нецитотоксический аналог ПГ-131 вводили в дозах 3,9; 7,9 и 15,8 мг/кг, эквивалентных дозам ПГ-132 по содержанию аминокислот.

Противоопухолевый эффект во всех исследованиях оценивали по следующим критериям: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) леченых животных по сравнению с контрольными.

ТРО вычисляли по формуле

$$ТРО = (V_k - V_o) / V_k \times 100 \%,$$

где V_k и V_o – средний объем опухолей (мм³) в контрольной и опытной группах соответственно.

УПЖ вычисляли по формуле

$$УПЖ = (СПЖ_o - СПЖ_k) / СПЖ_k \times 100 \%,$$

где СПЖ_к и СПЖ_о – средняя продолжительность жизни животных (дни) в контрольной и опытной группах соответственно.

Минимальные критерии активности – ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 25 % [16, 17].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием доверительных интервалов средних сравниваемых величин по стандартному методу Стьюдента. Для оценки достоверности различий определяли t-критерий, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Синтез пептидов осуществляли классическими методами пептидной химии по схеме, представленной на рисунке.

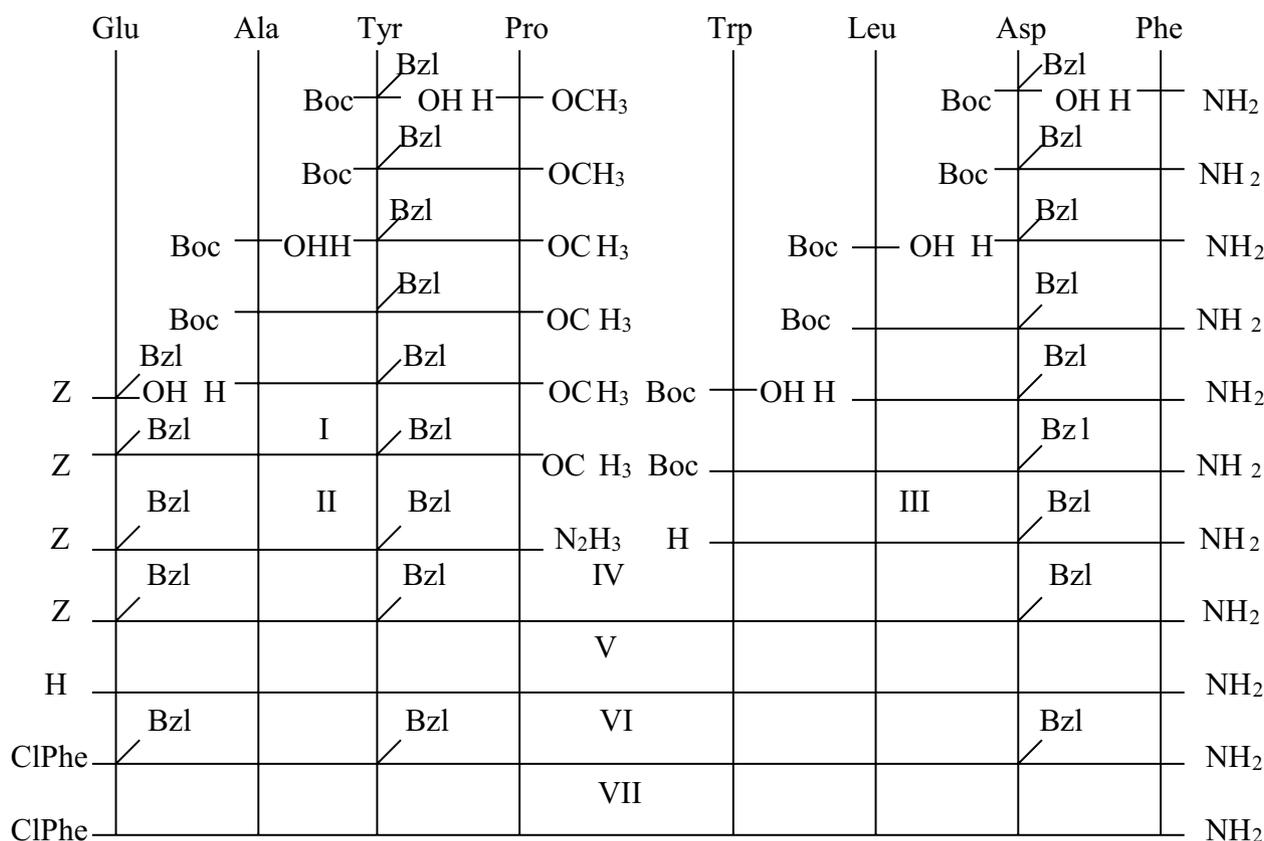
При синтезе фрагментов (10–13) и (14–17) использовали метод ступенчатого наращивания пептидной цепи на 1 аминокислотный остаток методом смешанных ангидридов. При синтезе фрагмента (10–13) исходными веществами являлись метиловый эфир пролина, *p*-нитрофениловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-*O*-бензил-тирозина и N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-аланин. Полученный защищенный тетрапептидгидразид (II) далее превращали в защищенный тетрапептид (III).

При синтезе фрагмента (14–17) исходными веществами были амид фенилаланина, N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- β -бензил-аспарагиновая кислота, N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-лейцин и N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-триптофан. Путем постепенного наращивания пептидной цепи, начиная с амида фенилаланина, методом смешанных ангидридов получили тетрапептид (III).

В результате азидной конденсации защищенных тетрапептидов (II и III) получили защищенный октапептид (IV). Очистку пептида проводили с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Выделенный после очистки октапептид подвергали удалению защитных групп каталитическим гидрированием.

Присутствие остатка триптофана в положении 14 в пептидах также наложило определенные ограничения на условия удаления защитных групп каталитическим гидрированием. В результате исследований подобраны условия для удаления бензильных групп тирозина и аспарагиновой кислоты. Защищенный пептид (IV) подвергали каталитическому гидрированию в присутствии палладиевой черни в растворе диметилформамида (ДМФА) в течение 4 ч. Выделение синтезированных пептидов после гидрирования проводили концентрированием растворов в вакууме.

В результате получили октапептид со свободными функциональными группами (V) – амид глутамилаланилтирозилпролилтриптофиллейциласпартилфенилаланина



10 11 12 13 14 15 16 17

(V) H-Glu-Ala-Tyr-Pro-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ (ПГ-131)

(VII) ClPhe*-Glu-Ala-Tyr-Pro-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ (ПГ-132)

Схема синтеза аналогов гастрина. ClPhe – хлорфенил ($(ClCH_2-CH_2)_2-N-C_6H_4-CH_2-CO-$)

H-Glu-Ala-Tyr-Pro-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ (ПГ-131),

R_f 0,2 (хлороформ–метанол (5:2)); R_f 0,75 (бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:1)); [α]_D – 32° (C = 1, ДМФА); содержание основного вещества 97,0 % (ВЭЖХ).

Цитотоксический аналог гастринина получили по аналогичной схеме.

В результате азидной конденсации защищенного тетрапептида CIPhe-Glu(Bzl)-Ala-Tyr(Bzl)-Pro-N₂H₃ и ранее синтезированного тетрапептида (III) был получен защищенный октапептид с цитотоксической группой на N-конце (VI).

Пептид (VI) подвергали каталитическому гидрированию в присутствии палладиевой черни в растворе ДМФА в течение 4 ч. Полученный пептид подвергали очистке на колонке с силикагелем в градиенте хлороформ–метанол. В результате получен цитотоксический аналог гастринина со свободными функциональными группами (VII) – амид п-ди(2-хлорэтил)аминофенилацетилглутамилаланилтирозилпролилтриптофиллейциласпартилфенилаланила

CIPhe-Glu-Ala-Tyr-Pro-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ (ПГ-132),

C₆₄H₇₉C₁₂N₁₁O₁₄; вычислено, %: Cl 5,47; найдено, %: Cl 6,1; R_f 0,12 (хлороформ–метанол (5:2)); R_f 0,65 (бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:1)); содержание основного вещества 96,0 % (ВЭЖХ).

Цитотоксическая активность. В предварительных экспериментах была выбрана величина исходной плотности посева клеток аденокарциномы человека линии НСТ116, позволяющая культивировать их в течение 72–96 ч в 96-луночных планшетах. Такому критерию соответствовала плотность посева 3×10^3 клеток/100 мкл среды/луноку. При исследовании цитотоксической активности веществ ПГ-131 и ПГ-132 было выявлено, что пролиферативная активность клеток аденокарциномы человека линии НСТ116 изменяется при их длительной инкубации (96 ч) с аналогами гастринина. При этом активность аналога, содержащего цитотоксическую группу (ПГ-132), была выше. При максимально возможной в экспериментах *in vitro* концентрации веществ (5×10^{-5} М) из-за их умеренной растворимости в среде жизнеспособность клеток в присутствии ПГ-132 снижалась на 40 %, в этих же условиях в присутствии ПГ-131 рост клеток замедлялся лишь на 15 %. Снижение концентрации сыворотки в среде инкубации до 1 % не повлияло на цитотоксическую активность исследуемых веществ.

Таким образом, исследование цитотоксической активности аналогов гастринина ПГ-131 и ПГ-132 на культуре клеток аденокарциномы кишечника человека линии НСТ116 показало, что аналог, в химиче-

ской структуре которого присутствует цитотоксическая группа, оказался активным.

Противоопухолевая активность. Сравнительную оценку противоопухолевой активности синтезированных аналогов гастринина проводили на перевиваемых опухолях ЖКТ мышей АКАТОЛ и АКАТОН, обладающих разным рецепторным статусом к аналогам гастринина.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что оба аналога гастринина оказались неэффективными на аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ, что связано с недостаточным количеством рецепторов гастринина ССК2 в этой опухоли.

Изучение действия аналогов гастринина было продолжено на аденокарциноме тонкой кишки мышей АКАТОН, экспрессирующей рецепторы к гастрину. Как видно из табл. 2, оба аналога гастринина (ПГ-132

Таблица 1. Противоопухолевая активность аналогов гастринина на аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ

Аналог гастринина	Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %, после окончания лечения			
			1-й день	7-й день	10-й день	16-й день
ПГ-132	5	2–6	3	8	7	7
	10	2–6	12	22	4	+7
	20	2–6	+27**	10	4	+11
ПГ-131	3,9*	2–6	+13	14	0	8
	7,9	2–6	31	6	+4	+11
	15,8	2–6	+14	21	14	12

*Доза 3,9 мг/кг эквивалентна дозе 5 мг/кг по содержанию аминокислот;

**знак «+» означает стимуляцию роста опухоли.

Таблица 2. Противоопухолевая активность аналогов гастринина на аденокарциноме тонкой кишки мышей АКАТОН

Аналог гастринина	Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %, после окончания лечения			УПЖ, %
			1-й день	7-й день	11-й день	
ПГ-132	5	2–6	74*	27	3	13
	10	2–6	60*	18	5	18
	20	2–6	70*	23	3	13
ПГ-131	3,9*	2–6	84*	39	12	22
	7,9	2–6	34	26	7	8
	15,8	2–6	69*	18	12	14

* $p < 0,05$ по отношению к контролю.

и ПГ-131) проявили максимальный противоопухолевый эффект сразу после окончания лечения в наименьших дозах — 5 и 3,9 мг/кг соответственно. При этом для ПГ-132 ТРО составило 74 %, а для ПГ-131 — 84 %. Зависимости противоопухолевого эффекта от величины введенной дозы не отмечалось.

При наблюдении за мышами во всех опытных группах в указанные сроки гибели животных не отмечалось.

Заключение

Классическими методами пептидной химии синтезированы 2 модифицированных аналога гастрин (октапептиды), 1 из которых содержит цитотоксическую группу, представленную хлорфенацилом.

Показана цитотоксическая активность аналога гастрин ПГ-132, в химической структуре которого присутствует цитотоксическая группа, на культуре клеток аденокарциномы кишечника человека линии НСТ116.

Установлена противоопухолевая активность цитотоксического (ПГ-132) и нецитотоксического (ПГ-131) аналогов гастрин на опухоли АКАТОН в дозах 5 и 3,9 мг/кг соответственно при ежедневном подкожном введении в течение 5 дней. ТРО непосредственно после окончания лечения составляло 74 и 84 % соответственно.

Аналоги гастрин ПГ-132 и ПГ-131 не обнаружили противоопухолевого действия на аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ при аналогичных дозах, режиме и способе введения.

Вывод

Противоопухолевая активность представленных аналогов гастрин ПГ-132 и ПГ-131 определяется, вероятно, их действием на рецепторы гастрин ССК2, которые экспрессированы только в опухолевых клетках аденокарциномы тонкой кишки мышей АКАТОН, и не зависит от наличия или отсутствия в химической структуре цитотоксической группы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lee Y.M., Beinborn M., McBride E.W. et al. The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor. Cloning and characterization. *J Biol Chem* 1993;268(11):8164–9. PMID: 7681836.
- Wank S.A., Harkins R., Jensen R.T. et al. Purification, molecular cloning and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(7):3125–9. PMID: 1313582.
- Ahmed S., Budai B., Herédi-Szabó K. et al. High and low affinity receptors mediate growth effects of gastrin and gastrin-Gly on DLD-1 human colonic carcinoma cells. *FEBS Lett* 2004; 556(1–3):199–203. PMID: 14706850.
- Rehfeld J. Gastrin and colorectal cancer: a never-ending dispute? *Gastroenterology* 1995;108(4):1307–10. PMID: 7698599.
- Watson S., Durrant L., Morris D. Gastrin: growth enhancing effects on human gastric and colonic tumour cells. *Br J Cancer* 1989;59(4):554–8. PMID: 2713241.
- Methods in Molecular Biology. Vol. 35: Peptide Synthesis Protocols. Ed. by M.W. Dunn. Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1994. Pp. 1–73.
- Martinez J., Rodriguez M., Bali J., Laur J. Phenylethylamide derivatives of the C-terminal tetrapeptide of gastrin. *J Med Chem* 1986;29(11):220–7. PMID: 3818170.
- Schally A.V., Nagy A. Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 1999;141(1):1–14. PMID: 10407215.
- Magrath I.T. Targeted approaches to cancer therapy. *Int J Cancer* 1994;56(2):163–6. PMID: 7906250.
- Morley J.S. Inhibitory effects of some amino acid. *Proc R Soc Lond B* 1968;170:97.
- Wunsch E., Moroder L., Göhring W. et al. Synthesis of human des-tryptophan-1, norleucine-12-minigastrin-II and its biological activities. *FEBS Lett* 1986;206(2):203–7. PMID: 3758347.
- Ahmed S.I., Wibowo F., Gembitsky D.S. et al. Importance of the C-terminal phenylalanine of gastrin for binding to the human CCK (2) receptor. *J Pept Res* 2001;58(4):332–7. PMID: 11606218.
- Оборотова Н.А., Смирнова Л.И., Круглова Г.В. и др. Средство для лечения миеломной болезни. Патент РФ № 2066183. 1996.
- Хайдуков Е.Я., Оборотова Н.А., Смирнова Л.И. и др. Способ получения сарколизина для внутривенных инъекций. Патент РФ № 2060031. 1996.
- Немцов Л.М. Патофизиологическое и клинико-диагностическое значение холецистокинина при билиарной патологии. *Обзор. Вестник ВГМУ* 2014;13(4):11–20.
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–57.
- Софьяна З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. М.: Медицина, 1980. С. 71–112.