На правах рукописи

ВАРВАШЕНЯ РУСЛАН НИКОЛАЕВИЧ

РАЗРАБОТКА ТАРГЕТНОГО РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ HER2-ПОЗИТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Томск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН **Чернов Владимир Иванович**

доктор фармацевтических наук, доцент **Ларькина Мария Сергеевна**

Официальные оппоненты:

Тищенко Виктория Константиновна, доктор биологических наук, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория экспериментальной ядерной медицины, заведующий лабораторией

Терентьева Светлана Владимировна, доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии, профессор кафедры

Ведущая организация:
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «___» _____2027 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», по адресу: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта http://tnimc.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук Минакова Мария Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время злокачественные новообразования занимают одно из ведущих мест в структуре причин смертности населения как в Российской Федерации, так и в мире (E. Choi et al., 2017). Рак молочный железы (РМЖ) является наиболее распространенным видом заболевания среди женского населения и составляет около 20% всех онкологических заболеваний у женщин (Siegel et al., 2023). Особое клиническое значение имеет гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста второго типа (HER2) на мембране клеток, которая выявляется в 16-20% случаев РМЖ.

Рецептор HER2, относящийся к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (ERBB), является ключевой молекулярной мишенью, прогностическим и предиктивным маркером, используемым при диагностике и таргетной терапии РМЖ (Arteaga, C. L., 2014, Н. Н. Бабышкина, 2020). По своей структуре HER2 представляет собой трансмембранную тирозинкиназную молекулу, которая в физиологических условиях экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток в ограниченном количестве и участвует в регуляции процессов клеточного роста и дифференцировки (Северин Е. С., 2011, О.Л. Поляновский, 2012). При злокачественной трансформации амплификация гена ERBB2 вызывает гиперэкспрессию HER2 на мембране клеток. Избыток рецепторов ведёт к нарушению сигнальных путей за счёт патологического образования димеров ERBB, что подавляет апоптоз, усиливает пролиферацию и определяет агрессивный фенотип опухоли (M. N. Broughton et al, 2017, Y. W. S. Jauw et al, 2019, Antonio C. Wolff, MD, et al, 2023, А. Стукань и др., 2023).

В современной клинической практике для лечения HER2-позитивного РМЖ эффективно используются таргетные препараты: трастузумаб, пертузумаб, трастузумаб-дерукстекан, трастузумаб-эмтанзин, а также ингибиторы тирозинкиназы — как в виде монотерапии, так и в составе комбинированных схем с химиотерапевтическими агентами (Eiger et al., 2019, Guarneri et al., 2012, Gebhart et al., 2016, Niikura et al., 2016). Отбор пациентов основан на определении HER2-статуса опухоли, для чего рутинно используют иммуногистохимические методы и гибридизацию *in situ*. К числу наиболее значимых недостатков относятся: инвазивный характер исследования, отсутствие возможности одномоментной оценки распространённости опухолевого процесса, внутриопухолевая гетерогенность, а также вероятность расхождения HER2-статуса между первичной опухолью и метастатическими очагами (Hanna et al., 2014, Peroja et al., 2016).

В связи с указанными ограничениями сохраняется актуальность разработки новых диагностических подходов, позволяющих с высокой точностью и достоверностью выявлять злокачественные новообразования с гиперэкспрессией HER2. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является радионуклидная молекулярная визуализация с применением таргетных молекул, обеспечивающих неинвазивную оценку молекулярных характеристик опухолевого процесса *in vivo*.

В современной практике радионуклидной диагностики ключевую роль играет технеций-99м (^{99m}Tc), который используется более чем в 80% диагностических радионуклидных исследований как в России, так и во всем мире. Широкое применение данного радионуклида обусловлено оптимальными физическими характеристиками: относительно короткий период полураспада (около 6 часов), оптимальным для регистрации гамма-излучением с энергией 140 кэВ и удобством

получения с помощью генераторов $^{99}Mo/^{99m}Tc$ для производства натрия пертехнетата непосредственно в медицинских учреждениях.

В последние годы значительный интерес в области разработки таргетных молекул проявляется к новому классу соединений — каркасным белкам, или «скаффолдам**»,** обладающим высоким потенциалом для радионуклидной визуализации (Поляновский и др., 2012). Каркасные белки соответствуют ряду требований, предъявляемых к эффективным таргетным агентам для радионуклидной визуализации: высокая аффинность, способность специфически связываться исключительно с целевым рецептором, отсутствие иммуногенности, высокая стабильность, а также возможность быстрой химической модификации, включая введение хелаторов и функциональных групп для радиомечения (Брагина и др., 2019, Ernst et al., 2019, Lindbo et al., 2016).

Начиная с 2010 года в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН под руководством академика РАН Деева С.М. проводится систематическая разработка и оптимизация рекомбинантных каркасных белков на основе анкириновых повторов (Designed ankyrin repeat protein, DARPin), обладающих высокой специфичностью к HER2. В рамках данного направления успешно завершена I фаза клинических исследований радиофармпрепарата $[^{99m}Tc]Tc(CO)_3$-$(HE)_3$-DARPin G3 в НИИ онкологии Томского НИМЦ (Bragina et al., 2022).

Полученные результаты показали, что DARPin G3, содержащий гистидил-глутаматную последовательность ($(HE)_3$) на N-конце, меченный технецием-99м, обеспечивает надёжную визуализацию HER2-позитивных опухолей, а также позволяет выявлять очаги в органах, характерных для метастатического поражения. Тем не менее, в ходе клинического применения был выявлен ряд ограничений, снижающих практическую применимость данного радиофармпрепарата. К ним относятся выраженное физиологическое накопление в органах выведения, прежде всего в почках и печени, а также сложная двухэтапная методика радиосинтеза, которая является малопригодной для рутинного использования в условиях медицинских организаций. Дополнительными недостатками являются относительно низкий радиохимический выход и необходимость последующей очистки препарата с применением эксклюзионной хроматографии (Bragina et al., 2022).

Выявленные ограничения указывают на необходимость дальнейших исследований, направленных на оптимизацию молекулярного дизайна DARPin-вариантов и совершенствование методов их радиомечения. Учитывая высокую диагностическую значимость неинвазивной оценки HER2-статуса и значительный потенциал каркасных белков DARPin, развитие данного направления представляется перспективным для создания функционально стабильного, технологически простого и пригодного для широкого клинического применения радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) для использования в медицинских организациях.

Степень разработанности темы исследования. Первый препарат $[^{99m}Tc]Tc(CO)_3$-$(His)_6$-DARPin9_29 был создан и исследован в клинике на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ. Препарат показал высокую стабильность, а также его выраженную специфичность к HER2-позитивным опухолям. К основным его недостаткам относились двухэтапная процедура радиомечения с трикарбонильным ^{99m}Tc из зарубежного коммерчески малодоступного набора, а также необходимость хроматографической очистки. Кроме того, отмечалось повышенное накопление радиофармпрепарата в печени, что делало его функционально непригодным визуализировать метастазы в этом органе. В рамках дальнейшей оптимизации был

клинически исследован препарат [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3$-(HE)$_3$-DARPin G3, который обеспечивал безопасность и хорошую переносимость, надёжную дифференциацию опухолей с высокой и низкой экспрессией HER2 и демонстрировал более высокие значения отношения «опухоль/печень» по сравнению с ранее изученным DARPin 9_29. Вместе с тем сохранялись ограничения, характерные для трикарбонильной химии радиомечения. Кроме DARPin, были разработаны и клинически оценены зарубежные каркасные белки — ADAPT6 и аффиболи. Они подтвердили высокую аффинность к HER2 и диагностическую пригодность, однако защищены патентными правами, что ограничивает их применение в РФ. В связи с этим разработка отечественных радиофармпрепаратов на основе DARPin, обладающих сопоставимыми или улучшенными диагностическими характеристиками при более высокой технологической доступности, представляет собой актуальное направление.

Цель исследования: разработка и исследование нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе технеция-99м и рекомбинантного таргетного белка DARPin G3 для диагностики рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2.

Задачи исследования:

1. Получить радиокомплексы технеция-99м с различными вариантами таргетных белков DARPin G3 и определить их стабильность *in vitro*.
2. Исследовать *in vitro* и *in vivo* функциональную пригодность для визуализации экспрессии HER2 новых вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами.
3. Изучить *in vitro u in vivo* влияние хелатора HYNIC и его положения в структуре на функциональную пригодность меченого DARPin G3 для визуализации экспрессии HER2.
4. Разработать состав, способ получения и методики контроля качества набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-($G_3S)_3C$, ^{99m}Tc».
5. Разработать способ получения и методики контроля качества готового препарата «DARPin G3-($G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», оценить его пригодность для клинического применения.
6. Разработать проект фармакопейной статьи на таргетный РФЛП «DARPin G3-($G_3S)_3C$, ^{99m}Tc».

Научная новизна. Впервые разработана линейка химически стабильных *in vitro* радиокомплексов ^{99m}Tc с различными вариантами DARPin G3 с пептидными или HYNIC-хелаторами с высокими радиохимическими выходами и чистотой.

Впервые доказана высокая специфичность и наномолярная аффинность к HER2 новых радиокомплексов, а также определена их медленная скорость интернализации с длительным удержанием в опухолевых клетках. Впервые *in vivo* установлена способность исследуемых комплексов специфически визуализировать опухоли с гиперэкспрессией HER2.

Впервые *in vivo* исследованы влияния типа хелатора, его положения и аминокислотных линкеров на биораспределение радиокомплексов вариантов DARPin G3. Установлено, что глицинсодержащие пептидные хелаторы или линкеры (G_3C и (($G_3S)_3C$) в структуре DARPin G3 значимо снижают его накопление в здоровых органах и тканях по сравнению с глутаматсодержащим пептидным хелатором или линкером (E_3C).

Впервые установлено, что варианты DARPin G3 с HYNIC-хелатором на N-концевой последовательности белка имеют меньшее накопление в здоровых органах и тканях по сравнению с вариантами, несущими хелатор на С-конце.

Впервые определено, что радиокомплекс оксотехнеция-99м с DARPin G3-$(G_3S)_3C$ имеет самое низкое удержание активности в почках и биораспределение более приближенное к ранее клинически апробированному варианту $[^{99m}Tc]Tc(CO)_3$-$(HE)_3$-DARPin G3.

Впервые разработан состав набора для приготовления радиофармацевтического лекарственного препарата на основе DARPin G3-$(G_3S)_3C$, а также предложены методики его контроля качества.

Впервые разработан одностадийный способ приготовления радиофармацевтического лекарственного препарата на основе DARPin G3-$(G_3S)_3C$, а также предложена методика определения радиохимической чистоты препарата.

Впервые установлено отсутствие острого токсического воздействия оптимального варианта DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в виде готового препарата «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» на организм экспериментальных животных (5 класс опасности).

Теоретическая и практическая значимость. Применение химии мечения ^{99m}Tc посредством ядра оксотехнеция-99м для таргетных белков DARPin G3 с пептидными хелаторами показало высокую эффективность *in vitro* и *in vivo* при создании РФЛП на основе DARPin и перспективна для аналогичных разработок в данной области.

По результатам проведенного исследования предложен новый эффективный и экспрессный способ получения радиокомплекса на основе ^{99m}Tc и каркасного белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$, аффинного к HER2, позволяющий изготавливать лекарственный препарат в одну стадию с высоким РХВ без очистки. Данный способ может быть применен для изготовления других радиокомплексов таргетных белков.

Разработан состав набора с химическим предшественником — оптимальным вариантом DARPin G3-$(G_3S)_3C$ для приготовления РФЛП и методики его контроля качества. Предложен проект фармакопейной статьи на разрабатываемый препарат на основе каркасного белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$, меченного ^{99m}Tc.

Результаты исследований послужили основанием для проведения в Томском НИИ онкологии Томского НИМЦ пилотных клинических исследований экспериментального препарата «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» для визуализации рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2 (ClinicalTrials.gov ID: NCT05923268), которое показало, что препарат является функционально пригодным, рекомендуются его дальнейшее клиническое исследование.

Методология и методы исследования. Настоящее исследование проводилось с применением современного лабораторного оборудования научных центров НИ ТПУ, ИБХ СО РАН, СибГМУ и Томского НИМЦ. Методология исследований выполнялась в полном соответствии с российскими и международными нормативными требованиями, включая стандарты Евразийского экономического союза и Государственной фармакопеи РФ. Экспериментальная часть *in vivo* проводились при соблюдении международных и российских нормативных требований. Эксперименты выполнены с использованием современных физико-химических методов исследования: радио-ТСХ, гамма-спектрометрии, УФ-спектрофотометрии, хромато-масс-спектрометрии, ВЭЖХ-МС/МС, электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и др. Статистическая обработка экспериментальных

данных проводилась с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad SoftwareInc, San Diego, USA).

Положения, выносимые на защиту:

1. Способы получения радиокомплексов ^{99m}Tc и вариантов DARPin G3, содержащего на С-конце пептидные хелаторы G_3C, E_3C или $(G_3S)_3C$, а также варианты белка с HYNIC-хелатором на N- или С-конце, конъюгированным с белком через пептидные линкеры, позволят получить соединение с высокой радиохимической чистотой. Радиокомплексы ^{99m}Tc с вариантами DARPin G3 с пептидными хелаторами превосходят по стабильности и РХВ радиокомплексы вариантов DARPin G3, конъюгированных с хелатором HYNIC, и ранее клинически апробированный вариант [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$-$(HE)_3$-DARPin G3.

2. Структура пептидного хелатора влияет на функциональную пригодность DARPin G3, меченного ^{99m}Tc. Наличие в структуре триглицилсеринового хелатора $(G_3S)_3C$ обеспечивает снижение поглощения комплекса печенью мышей, а также приводит к более высокой контрастности визуализации – соотношению опухоль/орган по сравнению с триглицин- (G_3C) и триглутамат-(E_3C) -содержащими хелаторами. Вариант с $(G_3S)_3C$ хелатором имеет распределение приближенное к ранее клинически апробированному варианту [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$-$(HE)_3$-DARPin G3.

3. Природа линкера и положение HYNIC-хелатора оказывает влияние на функциональную пригодность разрабатываемого РФЛП DARPin G3, меченного ^{99m}Tc. Расположение HYNIC-хелатора на N-концевой последовательности белка приводит к увеличению радиохимического выхода, а также наличие триглицилсеринового линкера $(G_3S)_3C$ приводит к значительному снижению накоплению в почках и в печени.

4. Разработанные состав фармацевтической композиции на основе химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$, способ получения стабильного готового препарата «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» и методики контроля качества применимы для проведения клинических исследований и включены в проект нормативной документации для готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc». Готовый препарат «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» не оказывает токсического воздействия на организм экспериментальных животных (класс относительно безвредных веществ).

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом полученных экспериментальных данных, а также использованием методов современного статистического анализа в соответствии с поставленными задачами. Основные положения диссертационной работы доложены на Международной научно-практической конференции «Разработка лекарств — традиции и перспективы» (Томск, 2023, 2024), Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2024), «Алмазовский молодёжный медицинский форум» (Санкт-Петербург, 2024).

Внедрение результатов исследования в практику. Научные положения и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, в настоящее время используются в проведении I фазы клинических исследований «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» NCT05923268 в НИИ онкологии Томского НИМЦ, а также применяются в процессе обучения студентов и аспирантов в научно-исследовательском центре «Онкотераностика» Томского политехнического университета.

Личный вклад автора. Автором лично выполнены все этапы исследования, начиная с анализа научной литературы и постановки исследовательских задач, заканчивая проведением экспериментов, обработкой полученных данных и формулированием выводов. Весь экспериментальный цикл, включая подготовку и проведение исследований, а также последующую интерпретацию результатов, осуществлен автором самостоятельно. Итоги работы отражены в подготовленных автором диссертационном исследовании и научных публикациях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 статьи в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, и входящих в международные базы данных и системы цитирования Scopus, Web of Science; 5 тезисов в материалах научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 220 странице машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы, приложений. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 47 рисунками, содержит 8 приложений. Библиография включает 162 источник, из них 9 отечественных, 153 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В первой главе проведён анализ отечественной и зарубежной литературы, посвящённой онкогенной роли HER2 и современным таргетным препаратам для HER2-направленной диагностики и терапии, включая моноклональные антитела и их фрагменты. Описана структура таргетных диагностических конъюгатов, а также влияние их размера на фармакокинетические свойства. Рассмотрен клинический опыт изучения альтернативных каркасных белков (DARPins) в качестве таргетных молекул визуализации экспрессии HER2. Обоснован выбор радионуклида ^{99m}Tc благодаря оптимальным ядерно-физическим характеристикам и доступности. Показана перспективность DARPin для визуализации HER2-экспрессирующих опухолей.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов, методов и методик исследования.

Характеристика и синтез белков. В работе использовали различные варианты белка DARPin G3, которые были получены в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ СО РАН с использованием *E. coli* BL21(DE3) с помощью убиквитин-подобного SUMO-тега и затем очищены.

Теоретически смоделированы и получены варианты DARPin G3 с пептидными хелаторами на С-конце: триглицилсодержащий хелатор (G3-G_3C), триглутаматсодержащий хелатор (G3-E_3C), триглицилсериновый хелатор, соединенный с DARPin G3 триглицилсериновым фрагментом, повторенным дважды (G3-$(G_3S)_3$C).

Также были получены варианты с аминокислотными линкерами на N-конце: DARPin CE_3-G3 и DARPin $C(G_3S)_3$-G3 и клинически апробированный вариант с глутамилгистидиновым тагом $(HE)_3$-G3.

Белки G3-G_3C, G3-$(G_3S)_3C$, G3-E_3C и CE_3-G3, $C(G_3S)_3$-G3 были конъюгированы с HYNIC-малеимидом на C- (G3-G_3C-HYNIC, G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC, G3-E_3C-HYNIC) и N- (HYNIC-CE_3-G3, HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3) концах.

Очистку белков осуществляли методом гель-фильтрации. Концентрацию определяли спектрофотометрически при 280 нм, чистоту и структуру подтверждали методами ВЭЖХ/МС и ВЭЖХ-МС/МС.

Клеточные линии. Для *in vitro* экспериментов использовали HER2-позитивные клетки SKOV-3 (аденокарцинома яичников) и SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы), а также HER2-негативные клетки PC-3 (аденокарцинома простаты) и Ramos (лимфома). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и пенициллином-стрептомицином при 37 °C и 5% CO_2.

Получение, контроль качества и оценка стабильности вариантов DARPin G3, меченных ^{99m}Tc. Все варианты предварительно восстанавливали дитиотреитолом (ДТТ), так как цистеинсодержащие белки имеют способность к спонтанной димеризации. После очистки на колонках NAP-5 мечение вариантов G3-G_3C, G3-E_3C, G3-$(G_3S)_3C$ проводили добавлением $[^{99m}Tc]TcO_4^-$ в присутствии глюконата натрия, ЭДТА и $SnCl_2$. Смесь инкубировали 30–60 мин при 60 °C. РХЧ определяли методом радио-ТСХ (iTLC) в двух системах растворителей. Для получения вариантов с HYNIC-хелатором (G3-G_3C-HYNIC, G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC, G3-E_3C-HYNIC, HYNIC-CE_3-G3, HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3) белки после восстановления конъюгировали с HYNIC-малеимидом (мольное соотношение 1:10, 1 ч при 40 °C). Очистку выполняли на NAP-5. Мечение проводили в присутствии трицина, ЭДДА и $SnCl_2$ (30 мин, 60 °C). Очистку выполняли на NAP-5, РХЧ определяли радио-ТСХ. Вариант $(HE)_3$-G3 метили трикарбонильным способом, в две стадии. На первой стадии получали трикарбонильный комплекс $[^{99m}Tc]Tc(CO)_3^+$ с использованием набора Isolink, затем инкубировали с $(HE)_3$-G3 (60 мин, 60 °C). Радиокомплекс очищали на NAP-5. Стабильность всех радиокомплексов оценивали при инкубации в PBS в течение 4 ч.

Методики изучения функциональной пригодности радиокомплексов in vitro. Для определения специфичности связывания использовали клетки SKOV-3, SK-BR-3 (HER2+) и PC-3 (HER2–). Клетки инкубировали с 1 нМ раствором ^{99m}Tc-меченых белков в течение 1 ч. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 100-кратного избытка немеченого DARPin G3 (блокирование целевых рецепторов).

Интернализацию вариантов DARPin G3 определяли на клетках SKOV-3. Клетки инкубировали с 1 нМ раствором радиокомплексов при 37 °C, затем мембранносвязанную фракцию удаляли кислотным промыванием (4 М мочевина/0,2 М глицин, pH 2,0), а интернализованную – после лизиса 1 М NaOH.

Константу диссоциации (K_D) определяли методом насыщения. Клетки SKOV-3 инкубировали с возрастающими концентрациями ^{99m}Tc-белков (от 0,22 до 40 нМ) при 4 °C в течение 4 ч. Специфическое связывание рассчитывали как разность общего и неспецифического (при блокировке рецепторов немеченым белком). K_D и B_{max} определяли с помощью программы Prism 9.

Изучение биораспределения и таргетных свойств in vivo. Все манипуляции с животными соответствовали директиве 2010/63/EU и были одобрены этическим комитетом (протокол IACUC №1 от 27.09.2022).

Изучение биораспределения проводили на мышах стока CD-1. Внутривенно вводили по 60 кБк каждого радиокомплекса (в дозе 3, 5 или 10 мкг белка на мышь). Через 4 ч после инъекции определяли накопление радиоактивности в органах и тканях (кровь, слюнные железы, лёгкие, печень, кишечник, желудок, селезёнка,

почки, мышцы, кости) методом гамма-спектрометрии. Результаты выражали как процент введённой дозы на грамм ткани (%ВД/г).

Специфическое накопление определяли на иммунодефицитных мышах линии Nu/J с привиты ксенотрансплантатами SKOV-3 (HER2+), PC-3 (HER2 низкая) и Ramos (HER2–). Накопление в органах и опухоли определяли через 4 ч после инъекции. Планарную сцинтиграфию проводили на гамма-камере Siemens E.Cam 180 через 4 ч после введения (8,2–8,6 МБк, 30 мин накопление импульсов).

Методики способа получения и контроля качества набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc». Набор состоял из лиофилизата, содержащего 3,3 мг восстановленного химического предшественника (DARPin G3-$(G_3S)_3C$), а также ЭДТА, $SnCl_2$, глюконат натрия, D-маннит, ПЭГ-4000 в фосфатном буфере. Идентификация химического предшественника в наборе проводилась методом электрофореза в ПААГ в невосстанавливающих условиях в соответствии и ВЭЖХ-МС/МС. Количественное определение химического предшественника проводили методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 280 нм. Расчет концентрации производили с использованием молярного коэффициента поглощения.

Методики получения и контроля качества готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc». В набор для приготовления РФЛП добавляли 500–700 МБк $[^{99m}Tc]TcO_4^-$, инкубировали 30 мин при 60 °С, разводили 0,9% раствором NaCl до 10 мл, проводили стерилизующую фильтрацию. Контроль качества включал определение РХЧ на примеси свободного пертехнетата и коллоида гидролизованного восстановленного технеция (ГВТ - $[^{99m}Tc]TcO_2$) методом радио-ТСХ в двух системах 0,01М PBS и ацетонитрил : вода (2:3), соответственно.

В анализе показателей качества РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» руководствовались требованиям ГФ РФ; оценку острой токсичности — проводили на крысах и мышах по 4 группы по 5 самцов и самок в каждой. Животным однократно внутривенно вводили дозу препарата, вели наблюдение жизненных показателей в течение 14 дней, после эвтаназировали.

Анализ и статистическая обработка данных. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=3–5). Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна–Уитни, однофакторного ANOVA с критерием Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Расчёты выполняли в программах Statistica 10.0, GraphPad Prism 9.0, MS Excel 2019.

Третья глава диссертации посвящена описанию результатов получения радиокомплексов вариантов DARPin G3 и исследованию их функциональной пригодности *in vitro* и *in vivo*.

Получение и восстановление вариантов DARPin G3, конъюгация с HYNIC хелатором. Были получены варианты белков DARPin G3-G_3C, DARPin G3-E_3C, DARPin G3-$(G_3S)_3C$, DARPin CE_3-G3, DARPin $C(G_3S)_3$-G3 и DARPin $(HE)_3$-G3. Анализ методом ПААГ подтвердил подлинность получаемых восстановленных белков, чистота составила более 95 %. Подлинность для вариантов DARPin G3-G_3C, DARPin G3-E_3C, DARPin G3-$(G_3S)_3C$ подтвердили методом ВЭЖХ-МС. Чистота белков составляла почти 100 %. Перекрытие аминокислотной последовательности для белков DARPin CE_3-G3, DARPin $C(G_3S)_3$-G3 и DARPin G3-$(G_3S)_3C$ с идентифицированными пептидными фрагментами составило 100 % для каждого белка (метод ВЭЖХ-МС/МС).

Конъюгацию с HYNIC-малеимидным хелатором проводили для вариантов белков с цистеином на С- и N-концах. Соотношение HYNIC и DARPin G3 для

конъюгации предложено использовать 10:1. Результаты анализа чистоты HYNIC-конъюгированных белков методом ПААГ в невосстанавливающих условиях показали, что уровень гомодимеров составлял не более 2 % для каждого варианта.

Получение ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с пептидными хелаторами и определение их стабильности. При разработке способа получения комплексов на основе ^{99m}Tc и DARPin G3 оценивали прямое влияние пептидной хелатирующей группы, содержащей цистеин на С-конце, на способность белка образовывать комплекс с таргетной молекулой DARPin G3. В качестве пептидных цистеинсодержащих хелаторов использовали G3-G_3C, G3-E_3C, G3-$(G_3S)_3$C. Предложенные хелатные группы представляют собой N_3S триамидтиольные хелаторы, для которых характерно образование стабильных комплексов с оксотехнецием ядром ([^{99m}Tc]TcO^{3+}). В качестве восстановителя в реакционной смеси предложено использовать дигидрат хлорида олова (II), для стабилизации в состав метящей смеси введен ЭДТА, так же в состав предлагается добавить глюконат натрия в качестве транс-хелатирующего лиганда (рисунок 1).

Были предложены методики мечения для получения комплексов G3-E_3C, G3-G_3C и G3-$(G_3S)_3$C с ^{99m}Tc в оптимизированных параметрах мечения. При разработке методики выявлено оптимальное время инкубации 30 мин для вариантов G3-G_3C и G3-$(G_3S)_3$C и 60 мин для варианта G3-E_3C, при температуре 60 °C. РХВ всех вариантов – более 98 %. Доказана высокая стабильность при хранении в течение 4 ч.

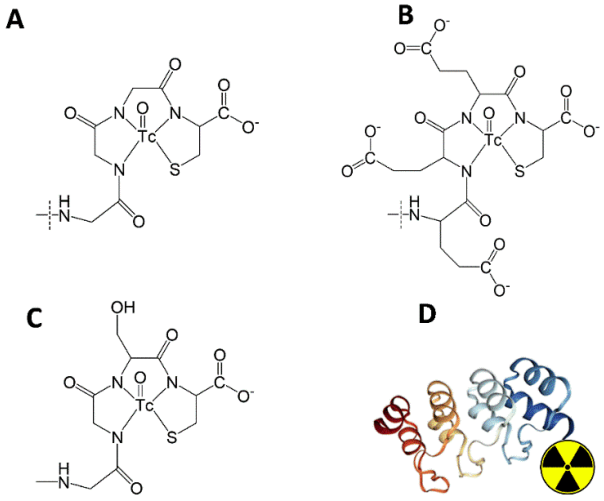


Рисунок 1 — Предполагаемая структура радиокомплексов (A) G3-G_3C, (B) G3-E_3C, (C) G3-$(G_3S)_3$C и (D) их расположение на С-конце G3-цепи DARPin G3

Получение ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором и определение их стабильности. В качестве восстановителя в реакционной смеси предлагается использовать дигидрат хлорида олова (II), для стабилизации и предотвращения образования коллоида ГВТ в составе метящей смеси предложено использовать солиганды — трицин и ЭДДА, которые обеспечивают насыщение координационной сферы ^{99m}Tc.

Первоначально для получения радиокомплексов на основе DARPin G3 и ^{99m}Tc использовали варианты DARPin G3 с HYNIC-хелатором, расположенным на С-конце. Для исследования влияния линкера на функциональную пригодность и биораспределение в качестве таких вариантов белков использовали белки с пептидными хелаторами (G3-G_3C, G3-E_3C, G3-$(G_3S)_3$C) (рисунок 2). Далее для

расширения дизайна использовали для конъюгации два белка DARPin G3 с аминокислотными линкерами на N-конце (CE_3-G3 и $C(G_3S)_3$-G3) (рисунок 2).

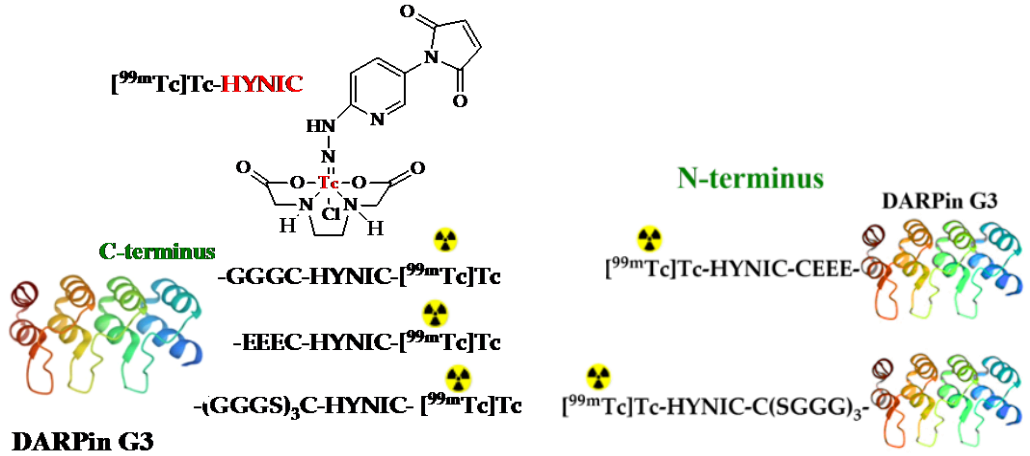


Рисунок 2 — Предполагаемая структура радиокомплексов и их расположение на C- и N-концах G3-цепи DARPin G3

[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC продемонстрировали заметно более низкие РХВ (около 50 %), чем [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC (РХВ в диапазоне 80-87 %). Положительного влияния изменения pH на увеличение РХВ не наблюдалось. Все варианты были очищены с использованием колонок NAP-5, обеспечивающих РХЧ более 96 %. Содержание коллоида ГВТ было 0,2−1,0 %. Все варианты продемонстрировали низкую стабильность (высвобождение активности 6-11%) через 4 ч инкубации в PBS. Однако после добавления 20 мкг/мл $SnCl_2$ в качестве антиоксиданта высвобождения ^{99m}Tc не наблюдалось (РХЧ ≥ 96 %, 4 ч).

Размещение хелатора HYNIC на N-конце белка повысило РХВ до 76-80 %. При этом в прямом сравнении РХВ для комплексов с хелатором HYNIC на C-конце белка были ниже и составили 58-61 %. Все соединения продемонстрировали высокую стабильность (РХЧ была больше 95 %) при хранении в PBS в течение 4 ч.

Получение радиокомплекса [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$-$(HE)_3$-DARPin G3. Мечение клинически апробированного варианта, содержащего глутамилгистидиновый хелатор, DARPin $(HE)_3$-G3 (рисунок 3) проводили по методике, описанной ранее (Vorobyeva et al., 2019). РХВ составил 72 ± 0 %, РХЧ после очистки на колонках NAP-5 – 97 %.



Рисунок 3 — Схематическое изображение [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$-$(HE)_3$-DARPin G3

Далее нижеизложенные исследования вариантов с пептидными хелаторами и с HYNIC-хелатором на C-конце проводили в прямом сравнении с клинически апробированным вариантом [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$-$(HE)_3$-G3. Исследование вариантов DARPin G3 с HYNIC-хелатором на N-конце проводили в прямом сравнении с аналогичными структурами вариантов с HYNIC-хелатором C-конце.

Результаты изучения in vitro ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3. Все исследованные варианты показали рецептор-специфичное связывание с HER2-экспрессирующими клетками SKOV-3 и SK-BR-3 (около 20-30 %), что указывает на отсутствие негативного влияния химии мечения на свойства связывания с мишенью. Уровень связывания со SKOV-3 и SK-BR-3 был значимо ($p < 0,05$) выше, чем уровень связывания с клетками PC-3 и со SKOV-3 и SK-BR-3 с блокированными рецепторами немеченым DARPin G3.

Для вариантов с пептидными хелаторами общей чертой являлось относительно низкое количество интернализованной активности (до 25 % к 4 ч). У глицинсодержащих вариантов интернализованная фракция достигала плато к 6 ч, а общая клеточно-ассоциированная активность после максимума к 4–6 ч снижалась. Такая картина характерна для неудерживаемых меток. Напротив, глутаматсодержащие хелаторы демонстрировали рост интернализованной активности без выраженного снижения общей связанной активности за 24 ч, что типично для удерживаемых меток. Для HYNIC-производных на С-конце клеточно-ассоциированная и интернализованная активности непрерывно увеличивались со временем и сохранялись до 24 ч. Через 4 ч интернализация достигла 17 ± 0, 18 ± 4, 12 ± 1 и 12 ± 0 % от общей клеточно-ассоциированной активности для [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC, [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, соответственно. N-концевые HYNIC-варианты также показали аналогичный профиль интернализованной активности, что и варианты с HYNIC на С-конце.

Все исследованные варианты DARPin G3 характеризуются наномолярной аффинностью, достаточной для молекулярной визуализации HER2-положительных опухолей (Таблица 1).

Таблица 1 — Равновесные константы диссоциации (K_D). Данные представлены как среднее значение для трех образцов ± S

	K_D, нМ	**B_{max}, рецепторы/клетка**
[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C	3,3 ± 0,5	(1,59 ± 0,07) x 10^6
[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C	4,1 ± 0,6	(1,49 ± 0,01) x 10^6
[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C	5,0 ± 0,9	(1,03 ± 0,06) x 10^6
[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC	2,3 ± 0,3	(1,08 ± 0,07) x 10^6
[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC	0,60 ± 0,15	(0,91 ± 0,22) x 10^6
[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC	2,3 ± 0,4	(1,07 ± 0,07) x 10^6
[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3	1,7 ± 0,2	(1,45 ± 0,03) x 10^6
[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3	1,7 ± 0,3	(1,33 ± 0,05) x 10^6
[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3	1,9 ± 0,2	(1,22 ± 0,03) x 10^6

Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств in vivo ^{99m}Tc-комплексов с DARPin G3 с пептидными хелаторами. Первоначальное исследование в мышах CD1 показало, что общей чертой всех вариантов было низкое сохранение активности в крови, мышцах и костях. Низкий уровень активности в ЖКТ позволяет предположить, что экскреция с желчью не играет значительной роли. Низкое накопление в желудке и слюнных железах свидетельствует об отсутствии высвобождения [^{99m}Tc]Tc-пертехнетата, т.е. о стабильности всех меток *in vivo*.

Клинически апробированный вариант [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 имел самое высокое сохранение активности в почках (143,2 ± 38,5 %). Использование различных пептидных хелаторов сильно влияло на накопление в почках, печени и селезёнке.

Поглощение [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C в почках было в 2,4 раза ниже, чем [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, но все же значительно выше, чем поглощение [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C. Вариант, содержащий G_3C, обеспечил значимо ($p < 0,05$) более низкое поглощение в почках, чем другие варианты.

Накопление в печени [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C (18,8 ± 4,2 %ВД/г) было самым высоким, а [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 (2,4 ± 0,3 %ВД/г) — самым низким. Накопление [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C имело промежуточные значения, существенной разницы между ними не было. Кроме того, вариант [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 имел наименьшее поглощение в лёгких, селезёнке и костях ($p < 0,05$). Очень высокое поглощение печенью [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C является нежелательным фактором. Данные о высоком накоплении в печени побудили нас исключить [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C из оценки на мышах с опухолями(рисунок 4).

Исследование таргетной специфичности этих вариантов показало, что накопление в ксенотрансплантатах SKOV-3 было значимо ($p < 0,005$, ANOVA) выше, чем в PC-3. Это свидетельствует о том, что уровень накопления коррелирует с уровнем экспрессии HER2 для всех вариантов, что указывает на специфическое связывание *in vivo*. Поглощение варианта [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C в ксенотрансплантатах SKOV-3 было значимо ($p < 0,05$, ANOVA) ниже, чем поглощение варианта [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 (рисунок 4). Биораспределение исследуемых вариантов у мышей Nu/J (SKOV-3) значимо не различалось от биораспределения у мышей CD1 или Nu/J (PC-3).

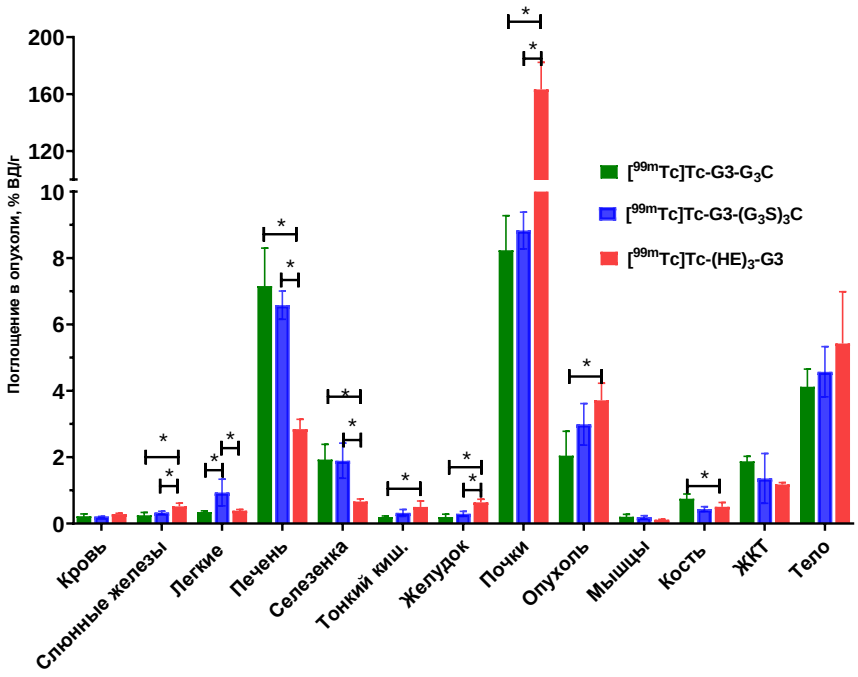


Рисунок 4 – Сравнительное биораспределение через 4 ч после введения у мышей Nu/jc ксенотрансплантатами SKOV-3 (n=4). Звездочками отмечены значимые различия ($p < 0,05$, ANOVA)

По данным гамма-визуализации варианты G3 показали способность различать ксенотрансплантаты с высокой и низкой экспрессией HER2 (рисунок 5).

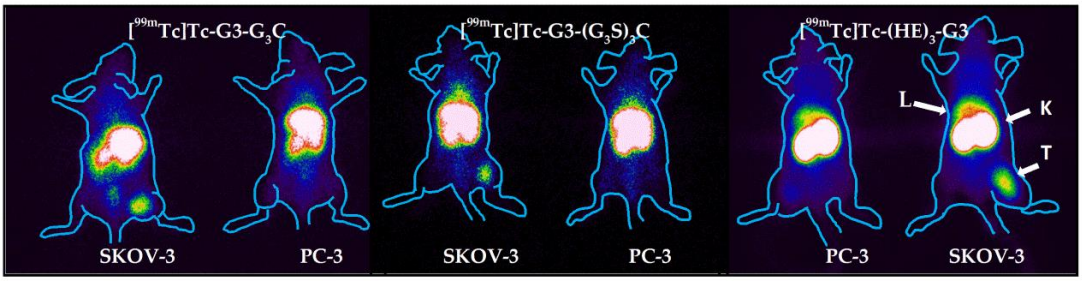


Рисунок 5 – Визуализация с помощью гамма-камеры экспрессии HER2 у мышей Nu/J с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3. L – печень, К – почки, Т – опухоль

При расчете соотношения «опухоль/орган» [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 обеспечил значимо ($p < 0,05$, ANOVA) более высокое соотношения «опухоль/печень», «опухоль/селезенка», «опухоль/легкое» и «опухоль/мышца», чем оба варианта с пептидными хелаторами. Вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C показал наиболее приближенные значения в биораспределении к клинически апробированному варианту.

Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на С-конце. На мышах стока CD1 показано, что все комплексы имели быстрое элюирование из крови через почки с последующей почечной реабсорбцией с высоким удержанием активности в почках. Захват глицинсодержащих вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC почками был в 10 и 3,3 раза ниже, соответственно, чем у [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. Вариант, содержащий $(G_3S)_3$C-HYNIC, обеспечивал статистически значимо ($p < 0,05$, ANOVA) более низкий захват в почках по сравнению с [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC.

Захват в печени для [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC, [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC был в 1,6, 2,5 и 8,6 раза выше, соответственно, чем для [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 ($p < 0,05$, ANOVA). Захват в печени для варианта, содержащего $(G_3S)_3$C-HYNIC, был в 1,6 раза ниже ($p < 0,05$, t-тест), чем для [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC. Стоит отметить, в исследовании вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C аналог без HYNIC имел более высокий захват в печени у мышей CD1, чем вариант, содержащий HYNIC.

Все изученные варианты [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC имели статистически значимо ($p < 0,05$, ANOVA) более высокий захват в слюнных железах и желудке по сравнению с [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. Вариант, содержащий E_3C-HYNIC, имел более высокий захват в легких, селезенке, тонком кишечнике, мышцах и костях по сравнению с другими вариантами ($p < 0,05$, ANOVA). Вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC имел значимо ($p < 0,05$, ANOVA) более низкий захват в слюнных железах и селезенке по сравнению с [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC.

На основании этих результатов вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC был выбран для оценки таргетных свойств *in vivo* в сравнении с вариантом [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. Результаты исследования специфичности *in vivo* подтвердили HER2-специфичный захват варианта [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и варианта [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, которые обеспечивали схожий уровень ассоциированной активности в опухолях SKOV-3 (3,1 ± 1,1 и 3,7 ± 0,5 %ВД/г, соответственно; $p > 0,05$, t-тест).

Исследование биораспределения выявило резкое различие в накоплении активности в почках [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC между мышами CD1 и Nu/j (13,6 ± 2,9 %ВД/г и 173 ± 21 % ВД/г, соответственно). Этот эффект может объясняться

биохимическими и метаболическими различиями между линиями мышей, которые могут приводить к разному удержанию радиометаболитов в почках [^{99m}Tc]Tc-$(G_3S)_3$C-HYNIC. Биораспределение у мышей с ксенотрансплантатами показало, что оба варианта имеют низкий захват в здоровых органах, кроме почек (рисунок 6).

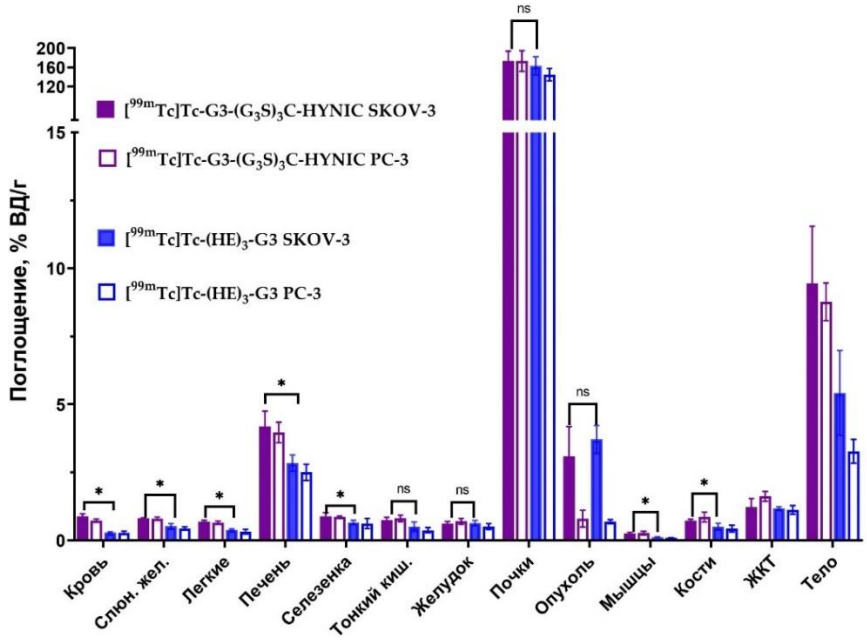


Рисунок 6 – Сравнительное биораспределение через 4 ч после инъекции у мышей Nu/j (n=4). Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$, непарный t-тест)

При прямом сравнении соотношения «опухоль/орган» [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC имел сравнимые, хотя и несколько более низкие, соотношения «опухоль/лёгкие» (ниже в 1,7 раза), «опухоль/селезёнка» и «опухоль/печень» (в 1,6 раза), чем [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. По данным визуализации варианты G3 способны различать ксенотрансплантаты с высокой и низкой экспрессией HER2.

Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на N-конце. Все варианты характеризовались низким удержанием активности в крови, низкое накопление в слюнных железах и желудке указывают на отсутствие высвобождения [^{99m}Tc]Tc-пертехнетата в мышах стока CD1. Активность в легких для вариантов G3-HYNIC с HYNIC на C-конце, примерно в 3 раза выше ($p < 0,05$), чем у вариантов с HYNIC на N-конце. Наиболее высокое накопление в костях наблюдалось у [^{99m}Tc]Tc-CE_3-HYNIC (2,9 ± 0,4 %ВД/г).

Высокий захват активности в почках наблюдался для всех меченых вариантов DARPin G3-HYNIC, при этом N-концевые комплексы демонстрировали достоверно более высокие уровни накопления активности ($p < 0,0001$) (в 1,5 раза) по сравнению с таковым для вариантов G3-HYNIC с C-концевой модификацией.

Захват в печени N-концевых комплексов ([^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 – 3,6 ± 0,4 %, [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 – 3,1 ± 0,3 %) был значимо ниже ($p < 0,0001$), чем у C-концевых комплексов ([^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC – 17,2 ± 0,8 %, 12,75 ± 1,57 %).

Поглощение [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 в печени и селезенке у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 было статистически значимо ($p < 0,05$, ANOVA) ниже, чем поглощение [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC. По сравнению с [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3, [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3

показал более высокое удержание активности в крови. Распределение активности для всех вариантов G3-HYNIC у мышей с ксенотрансплантатом SKOV-3 было схожим с распределением, полученном на мышах стока CD1. Поглощение в печени [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G_3S)$_3$-G3 у мышей Nu/j было в 2 раза ниже, чем у других вариантов.

Характер удержания в почках у мышей Nu/j изменился по сравнению с мышами CD1. Не было статистически значимой разницы в почечном накоплении между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G_3S)$_3$-G3 у мышей CD1, тогда как у мышей Nu/j наблюдалась статистически значимая разница ($p < 0,05$) в поглощении этих вариантов (рисунок 7).

При прямом сравнении соотношения «опухоль/орган» [^{99m}Tc]Tc-G3-(G_3S)$_3$C-HYNIC обеспечил статистически значимо ($p < 0,05$, ANOVA) более высокие соотношения («опухоль/кровь» = 2,4:1, «опухоль/слюнные железы» = 2,78:1, «опухоль/желудок» = 2,25:1) по сравнению с вариантам [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-E$_3$C-G3. Тем не менее, значение соотношения «опухоль/печень» для N-концевого варианта [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G_3S)$_3$-G3 приближается к 1:1. По данным гамма-визуализации варианты G3 способны различать ксенотрансплантаты с высокой и низкой экспрессией HER2.

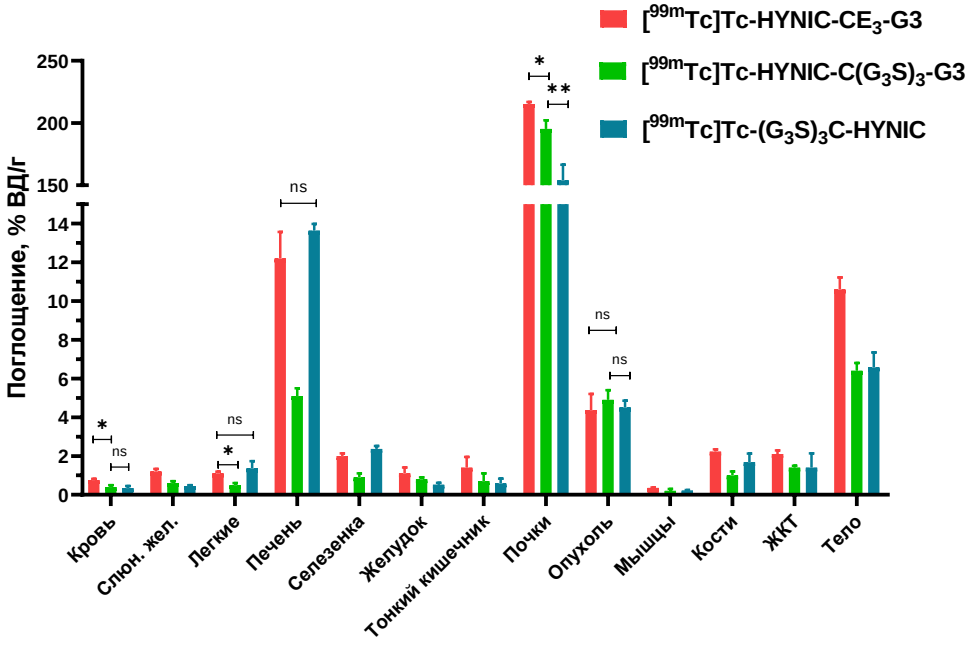


Рисунок 7 – Сравнительное биораспределение через 4 ч после инъекции у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 (n=4). Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$, ANOVA)

Четвертая глава посвящена фармацевтической разработке РФЛП «DARPin G3-(G_3S)$_3$C, ^{99m}Tc». Вариант DARPin G3-(G_3S)$_3$C обеспечивает высокий РХВ (более 98 %) и стабильность комплекса, обеспечивает накопление в HER2-положительных опухолях, сопоставимое с вариантом DARPin (HE)$_3$-G3 ($K_D \approx 2–5$ нм) при сопоставимых уровнях специфического накопления *in vivo* в ксенотрансплантатах человека на мышиной модели. При этом DARPin G3-(G_3S)$_3$C в стандартных доклинических исследованиях демонстрировал близкое соотношение «опухоль/орган» для печени, лёгких и других тканей по сравнению с DARPin (HE)$_3$-G3. В совокупности эти факторы обосновывают выбор DARPin G3-(G_3S)$_3$C для

рекомендации его к проведению клинических исследований и фармацевтической разработки РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc».

Разработка состава и способы получения набора и готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» из него.

Разработка способа получения набора для приготовления РФЛП представляет собой ключевой этап трансляции молекулы DARPin G3-$(G_3S)_3C$ из исследовательского формата в клиническую практику. Создание стандартизованного набора позволяет обеспечить воспроизводимость и стабильность процессов мечения ^{99m}Tc в условиях медицинской организации.

Количество химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ для получения одного лиофилизата использовали 3 мг, что соответствует количеству белка в клинически апробированном препарате [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$-$(HE)_3$-DARPin G3.

Подбор состава вспомогательных веществ проводили в два этапа. Первый этап заключался в подборе состава метящей смеси. Был выбран глюконат натрия**,** выполняющий функцию солиганда в процессе восстановления ^{99m}Tc, ЭДТА для связывания примесей катионов металлов, $SnCl_2$ — восстановитель. Исследовали три состава метящей смеси с различным содержанием вспомогательных веществ с последующим проведением контроля качества полученного радиокомплекса. На втором этапе дополнительно в состав реакционной системы был введён D-маннит, выполняющий функции крио- и лиопротектора. В качестве вспомогательной стабилизирующей добавки использовали полиэтиленгликоль-4000 (ПЭГ-4000).

На серии лиофилизатов DARPin G3-$(G_3S)_3C$ было подтверждено, что применение в сочетании D-маннита и ПЭГ-4000 оказывает стабилизирующее влияние на DARPin G3-$(G_3S)_3C$ при замораживании и сушке, а также положительный эффект на воспроизводимость восстановления лиофилизата.

Таким образом, оптимальный состав вспомогательных веществ в 0,01 М PBS (pH 7,4): ЭДТА — 0,1 мг, дихлорид олова (II) — 0,075 мг, глюконат натрия — 5 мг, D-маннит — 0,66 мг, ПЭГ-4000 — 0,33 мг. Количество химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в одном флаконе лиофилизата — 3,3 мг.

Для разработки способа получения готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» из набора за основу использовали условия мечения (инкубация 60 °C, 30 мин).

Полученные данные свидетельствуют о том, что применяемый состав набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» формирует достаточно стабильные комплексы с технецием, восстановленным ионами Sn(II) до IV- и V-валентного состояния, что делает его применимым для фармацевтической разработки.

Оценка функциональной пригодности химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в составе набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc».

Перед клиническими испытаниями необходимо подтверждение функциональной пригодности DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в составе полной композиции в форме лиофилизата. Изменение состава лекарственной формы, переход белка из раствора в лиофильное состояние может привести к снижению или полному отсутствию его функциональной пригодности для визуализации HER2 и требует оценки этих свойств в *in vitro* и *in vivo* экспериментах.

После добавления элюата пертехнетата натрия, полученного с генератора, к лиофилизату реакционную смесь инкубировали при нагревании в соответствии с ранее описанной методикой (60 °C, 30 мин). При этом РХЧ образующегося радиокомплекса ^{99m}Tc-G3-$(G_3S)_3C$ составляла 98 ± 1%. Показано, что предложенная методика мечения раствора белка G3-$(G_3S)_3C$ является воспроизводимой и

применимой для лиофилизированной формы, обеспечивая получение радиокомплекса высокой РХЧ без необходимости дополнительной стадии очистки.

Сравнение данных *in vitro* и *in vivo* [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$, полученного из лиофилизата, и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$, полученного из раствора белка, не подвергавшегося технологическим воздействиям, позволяет утверждать, что не выявлены изменения в функциональной пригодности белка из лиофилизата. Таким образом, белок из лиофилизата в подобранной композиции имеет схожие функциональные свойства с нативным белком.

Разработка и валидация методик контроля качества химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в составе набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc». Для разработки методик для контроля качества, значений показателей качества и проекта НД в качестве экспериментальных образцов набора для изготовления разрабатываемого препарата «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» использовали несколько серий. Каждый флакон набора для изготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» содержит 3,3 мг DARPin G3-$(G_3S)_3C$.

Для химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в составе лиофилизата были предложены методики ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС, (определение показателя «Идентификация»), УФ-спектрофотометрия (для показателя «Количественное определение») и электрофорез в ПААГ (для определения показателя «Родственные примеси» и «Идентификация»), а также проведены необходимые испытания по оптимизации и валидации методик с учетом состава набора.

Подлинность DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в наборе была подтверждена с использованием ВЭЖХ-МС (рисунок 8). Масс-спектр показал, что белок в основном присутствует в форме гомодимера (Mw = 28149,8 Да).

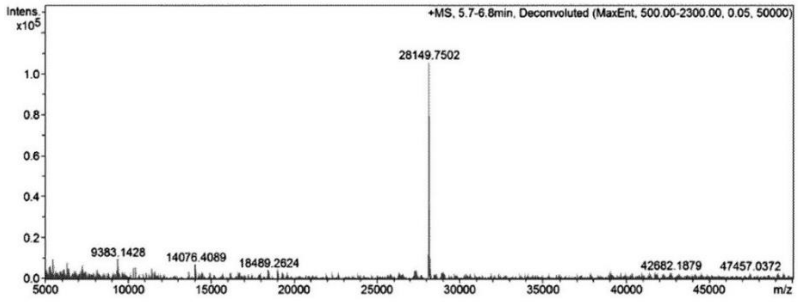


Рисунок 8 – Деконволюция масс-спектра DARPin G3-$(G_3S)_3C$

Определение молекулярной массы химического предшественника методом электрофореза проводили путем сравнения его относительной подвижности с подвижностью белков маркеров. Значение R_f белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$ составило 0,717 ± 0,015. Рассчитанная молекулярная масса равна 13,58 ± 0,82 кДа (n=4, RSD=10%) (рисунок 9).

Учитывая подтвержденную линейную зависимость ($r > 0,95$) R_f от логарифма молекулярной массы, было предложено в рутинном анализе проводить идентификацию без расчета молекулярной массы белка посредством сравнения положения полосы относительно маркера 15 кДа, для этой цели предложено наносить 2 мкг белка в лунку концентрирующего геля.

Белок DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в своей структуре содержит цистеин на С-конце, поэтому в процессе получения, хранения способен образовывать дисульфиды белка в форме гомодимера. В связи с этим электрофорез в полиакриламидном геле следует проводить в невосстанавливающих условиях для контролирования предела

содержания родственной примеси гомодимера. Для определения примеси гомодимера, с учетом невысокой чувствительности метода и детектирующего раствора Кумасси, необходимо помещать не менее 40 мкг белка в аликвоте 6 мкл из исходного раствора. При этом на электрофореграмме также допускается наличие дополнительных полос, кроме основной полосы белка и примеси гомодимера. При анализе пяти серий лиофилизата содержание примеси гомодимера, определенной электрофорезом в ПААГ, не превышало 3 %, другие белковые примеси наблюдались не более 1 %. Для разрабатываемого лиофилизата предел содержания примеси гомодимера предложено определить не более 5 %. Наличие других белковых примесей предложено контролировать с требованием к качеству как не более 2,5 %.

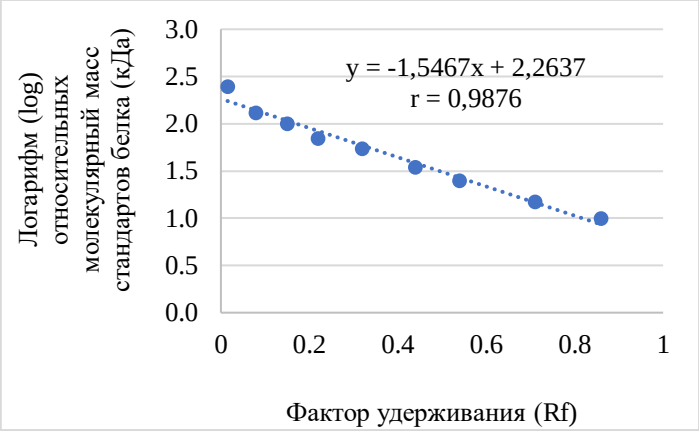


Рисунок 9 – График линейной регрессии относительных молекулярных масс (M_r) белка маркера от значений их факторов удерживания R_f

По результатам ВЭЖХ-МС/МС было определено 100 % перекрытие аминокислотной последовательности целевого белка с идентифицированными пептидными фрагментами. Содержание предполагаемых примесей других белков составило не более 2 %. Методика для определения первичной структуры белка G3-$(G_3S)_3C$ позволяет с высоким процентом перекрытия идентифицировать аминокислотную последовательность и также характеризует чистоту белка.

Методика количественного определения белка G3-$(G_3S)_3C$ предложена в соответствии требованиями ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка» (метод 1) при длине волны 280 нм. Для расчета содержания белка G3-$(G_3S)_3C$ в лиофилизате был выбран способ расчета через молярный показатель поглощения, поскольку белок имеет высокую степень очистки. Предлагаемое нами требование к содержанию белка G3-$(G_3S)_3C$ в лиофилизате составляет ± 10 % от номинального содержания. Валидация была проведена по показателям: специфичность, линейность (коэффициент корреляции = 0,9923, y= 0,2311*x - 0,0148), сходимость и внутрилабораторная прецизионность (Таблица 2) и правильность (процент открываемости 98-102 %).

Таблица 2 — Оценка прецизионности методики определения содержания G3-$(G_3S)_3C$

	$\bar{x}$, мг в лиофилизате	f	S	$S_{\bar{x}}$	$RSD_{\bar{x}}$, %	*p*	$t_{(p,f)}$	$\Delta\bar{x}$
Сходимость	3,296	8	0,0323	0,0114	0,98	0,95	2,31	0,025
Внутрилабораторная прецизионность	3,291	8	0,0265	0,0094	0,81	0,95	2,31	0,204

Оптимизация методики определения радиохимических примесей готового РФЛП «DARPin G3-(G3S)3C, ^{99m}Tc». Для определения радиохимических примесей был предложен метод радио-ТСХ. Основными предполагаемыми радиохимическими примесями в разрабатываемом препарате согласно способу получения могут быть свободные пертехнетат-ионы [^{99m}Tc]TcO_4^- (примесь А) и восстановленный гидролизованный технеций [^{99m}Tc]TcO_2 (примесь В). В качестве пластинок были выбраны полоски iTLC. В качестве подвижной фазы для определения примеси А обосновано использовать 0,01 М фосфатный буферный раствор с pH 7,4. Для определения примеси В — ацетонитрил : вода (2:3). Методика прошла процедуру валидации по показателю прецизионности.

Результат анализа стерильности и апирогенности. Определение содержания бактериальных эндотоксинов и стерильности проводили на базе лаборатории 31 НИ ТПУ (отдел микробиологического контроля) в соответствии с ГФ РФ нескольких серий. Параметры определяли как для набора, так и для готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc». Определенная в анализе концентрация БЭ в пяти сериях готового РФЛП составила не более 10 ЕЭ/мл. Объем препарата составляет 10 мл, следовательно, содержание БЭ в разрабатываемом препарате не превышает требований ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты». Посевы на тиогликолевой среде и среде Сабуро роста микроорганизмов не выявили. Все серии набора для РФЛП и готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» были стерильны.

Результаты исследования острой токсичности. В эксперименте показано, что однократное внутривенное введение РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» в трех дозах, предусмотренных дизайном исследования, в течение 24 ч после введения и 14 дней после отмены препарата не вызвало гибели животных, каких-либо патологических изменений их общего состояния, внешнего вида, аппетита, поведения и двигательной активности животных. Таким образом, РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» не оказывает токсического влияния на лабораторных животных в выбранных условиях экспериментального исследования.

Разработка проекта фармакопейной статьи на таргетный РФЛП «DARPin G3-(G3S)3C, ^{99m}Tc». Основные показатели, включенные в проект ФС на набор и на готовый РФЛП **«**DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc**»**, разработаны с учетом требований ОФС. К предлагаемым показателям качества предложены и обоснованы требования. Проект ФС представлен в приложении диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каркасные белки, в том числе DARPins, перспективны для радионуклидной визуализации HER2. Первый отечественный DARPin, меченный ^{99m}Tc через трикарбонильный комплекс, проявил специфичность, но требовал двухэтапного мечения, очистки и избыточно накапливался в почках и в печени. Вариант [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-DARPin G3 улучшил соотношение «опухоль/печень», однако трикарбонильная химия сохраняла недостатки. Зарубежные аналоги (ADAPT6, аффибоди) защищены патентами, поэтому разработка отечественных DARPins с одностадийным мечением остается актуальной.

Проведено сравнительное исследование серии вариантов DARPin G3 с ^{99m}Tc. Подобраны оптимальные условия радиомечения для серии вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами и HYNIC-хелатором на N- и C-концах. Все варианты специфично и насыщаемо связывались с HER2-положительными клетками SKOV-3 (K_D 1,9–5,0 нМ). *In vivo* на ксенотрансплантатах SKOV-3 и PC-3 [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и

[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ визуализировали опухоли с разным уровнем HER2, но по совокупности характеристик несколько уступали клинически апробированному [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 на мышиной модели.

Замена пептидного хелатора на HYNIC существенно изменила биораспределение: накопление в печени и селезёнке снизилось, но удержание в почках сильно возросло.

На основе DARPin G3-$(G_3S)_3C$ создан лиофилизированный набор, разработаны и валидированы методики контроля качества химического предшественника и готового РФЛП; методики, показатели качества и требования к ним внесены в проект фармакопейной статьи. Полученная нормативная база позволяет проводить дальнейшую клиническую апробацию «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc».

ВЫВОДЫ

1. Предложены оптимизированные методики получения с высокой радиохимической чистотой (более 95%) линейки радиокомплексов ^{99m}Tc и вариантов DARPin G3, содержащими на С-конце пептидные хелаторы G_3C, E_3C или $(G_3S)_3C$, а также с вариантами с HYNIC-хелатором на N- или С-конце, присоединённым через пептидные линкеры. Показано, что радиокомплексы на основе пептидных хелаторов превосходят по простоте получения, стабильности и радиохимическому выходу как HYNIC-производные, так и ^{99m}Tc-карбонильный комплекс DARPin $(HE)_3$-G3.

2. Доказано, что все новые радиокомплексы обладают низкой наномолярной аффинностью (1-5 нМ) к рецептору HER2 и высокой специфичностью связывания, пропорциональной уровню экспрессии, а также отличаются медленной интернализацией и длительным удержанием в опухолевых клетках. *In vivo* установлена их способность избирательно визуализировать опухоли с гиперэкспрессией HER2.

3. Выявлено влияние типа хелатора, его положения (N- или С-конец) и аминокислотного состава линкера на биораспределение ^{99m}Tc-радиокомплексов DARPin G3 *in vivo*. Показано, что глицинсодержащие пептидные хелаторы и линкеры (G_3C, $(G_3S)_3C$) значимо снижают накопление активности в здоровых органах и тканях по сравнению с глутаматсодержащим аналогом (E_3C). Варианты DARPin G3, несущие HYNIC-хелатор на N-конце, характеризуются меньшим накоплением в нецелевых тканях, чем варианты с тем же хелатором на С-конце. Установлено, что радиокомплекс ^{99m}Tc с DARPin G3-$(G_3S)_3C$ имеет наиболее низкое удержание активности в почках и в печени, а его профиль биораспределения наиболее близок к ранее клинически апробированному варианту ^{99m}Tc-карбонильному комплексу DARPin $(HE)_3$-G3.

4. Разработаны состав и способ получения набора в виде лиофилизата для приготовления РФЛП на основе DARPin G3-$(G_3S)_3C$. Оптимизированный состав лиофилизата на один флакон включает: химический предшественник – DARPin G3-$(G_3S)_3C$ (3,3 мг), восстановитель дихлорид олова (II) (0,075 мг), солиганды глюконат натрия (5 мг) и ЭДТА (0,1 мг), криопротекторы и стабилизаторы D-маннит (0,66 мг) и ПЭГ-4000 (0,33 мг). Для контроля качества химического предшественника в наборе разработаны и валидированы аналитические методики: подтверждение подлинности предложено выполнять методами ВЭЖХ-МС или ВЭЖХ-МС/МС; для подлинности и полуколичественной оценки белковых примесей обосновано применение электрофореза в ПААГ; количественное определение – методом УФ-спектрофотометрии.

5. Разработана простая и эффективная методика получения готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» из набора в одну стадию при инкубации 60 °С 30 мин с последующей стерилизующей фильтрацией, позволяющая получать стерильный раствор с высокой радиохимической чистотой (более 97%), не требующей очистки. Доказано, что готовый препарат является стерильным, соответствует фармакопейным требованиям по содержанию эндотоксинов и не обладает острой токсичностью (V класс опасности). Подтверждена в *in vitro* и *in vivo* исследованиях функциональная пригодность готового препарата, полученного по разработанному составу и способу.

6. Для контроля содержания радиохимических примесей в готовом препарате разработана методика радио-ТСХ. Предложено использовать неподвижную фазу – силикагель, нанесённый на стекловолокно, и две системы подвижных фаз: 0,01 М фосфатный буфер – для определения свободных ионов $[^{99m}Tc]TcO_4^-$ и комплексов с солигандами ($[^{99m}Tc]$Тс-ЭДТА и $[^{99m}Tc]$Тс-глюконат); ацетонитрил : вода (2:3) – для определения примеси восстановленного гидролизованного технеция $[^{99m}Tc]TcO_2$. На основе предложенных и валидированных методик контроля качества разработан проект фармакопейной статьи на таргетный РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Comparative Preclinical Evaluation of HYNIC-Modified Designed Ankyrin Repeat Proteins G3 for the ^{99m}Tc-Based Imaging of HER2-Expressing Malignant Tumors / M. Larkina, R. Varvashenya, F. Yuldasheva, E. Plotnikov, E. Bezverkhniaia, M. Tretyakova, R. Zelchan, A. Schulga, E. Konovalova, A. Vorobyeva, M. Belousov, A. Orlova, V. Tolmachev, S. Deyev // **Molecular Pharmaceutics**. – 2024. – Vol. 21, no. 4. – P. 1919-1932.

2. Оценка функциональной пригодности лиофилизата таргетных каркасных белков с анкириновыми повторами для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2/neu в злокачественных опухолях / Р.Н. Варвашеня, А.А. Прач, Е.В. Плотников, С.М. Деев, М.В. Белоусов, М.С. Ларькина, В.И. Чернов // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2024. – Т. 23, № 3. – С. 16-24.

3. Варвашеня, Р.Н. Изучение новых таргетных радионуклидных агентов для молекулярной диагностики экспрессии HER2 в злокачественных новообразованиях / Р.Н. Варвашеня, А.С. Фоминых, Г.Е. Янович, А.А. Прач // материалы XXV Юбилейной Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.П. Лопатинского. В 2 томах. Том 1 (г. Томск, 20–24 мая 2024 г.). / Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2024. – 458 с.

4. Варвашеня, Р.Н. Изучение новых таргетных радионуклидных агентов для молекулярной диагностики экспрессии HER2 в злокачественных новообразованиях / Р.Н. Варвашеня, А.С. Фоминых, Г.Е. Янович, А.А. Прач // тезисы Алмазовского молодежного медицинского форума — 2024. (г Санкт-Петербург, 11-16 мая 2024) / Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации: Издательство «ФОНД АЛМАЗОВА» — 715 с.

5. Варвашеня, Р.Н. Изучение новых таргетных радионуклидных агентов для молекулярной диагностики экспрессии HER2 в злокачественных новообразованиях / Р.Н. Варвашеня, А.А. Прач, А.С. Фоминых // II Всероссийская конференция международным участием «Молодые лидеры в медицинской науке» (г.Томск, 20-21 мая 2024 г.): сборник материалов – Томск: Изд-во СибГМУ, 2024. – 178 с.

6. Варвашеня, Р.Н. Сравнительная оценка HYNIC-модифицированных DARPin G3 меченных технецием-99м для визуализации злокачественных новообразований, экспрессирующих HER2 / Р.Н. Варвашеня, Е.А. Безверхняя, М.С. Третьякова,

Ф.Ш. Юлдашева, А.С. Фоминых, Е.В. Плотников, А.А. Шульга, Е.В. Коновалова, А.Г. Воробьева, М.В. Белоусов, В. Толмачев, М.С. Ларькина, С.М. Деев // Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы. III Международная научно-практическая конференция (г. Томск, 18-20 сентября 2024 г.): сборник материалов – Томск: Изд-во СибГМУ, 2024. – 275 с.

7. Варвашеня, Р.Н. Разработка методик контроля качества химического предшественника – рекомбинантного белка с анкириновыми повторами для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2 в злокачественных опухолях / Р.Н. Варвашеня, Г.Е. Янович, Е.В. Плотников, А.А. Шульга, Е.В. Коновалова, Р.Х. Зиганшин, С.М. Деев, К.С. Бразовский, М.В. Белоусов, В.И. Чернов, М.С. Ларькина // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2025. – Т. 14, № 4. – С. 138-151.

8. Варвашеня, Р.Н.. Оценка новых таргетных радионуклидных препаратов, модифицированных HYNIC, для визуализации злокачественных новообразований, экспрессирующих HER2 / Р.Н. Варвашеня, М.С. Ларькина, Е.В. Плотников, Е.А. Безверхняя, Р.В. Зельчан, М.В. Белоусов, В.М. Толмачев // Медицинские и экологические эффекты ионизирующего излучения: материалы VIII Международной научно-практической конференции, 09-11 сентября 2025 г., г. Томск / Отв. ред. Р.М. Тахауов. – Томск: ООО "АлКом", 2025. – 187 с.

9. Larkina, M. The position of 99mTc-HYNIC and the molecular design of the DARPin G3 constructs influence the selection of an imaging tracer to detect expression in HER2-expressing tumors / M. Larkina, R. Varvashenya, A. Prach, R. Zelchan, A. Schulga, E. Konovalova, A. Orlova, V. Tolmachev, S. Deyev // **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.** – 2026. – Vol. 335. – P. 1945-1959.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

%ВД/г – процент введенной дозы на грамм
ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ
B_{max} – количество сайтов связывания на клетку
HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека второго типа
HYNIC – 2-гидразинопиридин
iTLC – ТСХ пластинка со стекловолокном и слоем силикагеля
K_D – константа диссоциации
PBS – 0,01 М фосфатный буфер
R_f – фактор удерживания
ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ДТТ (DTT) – дитиотреитол
ОФС – общая фармакопейная статья
ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле
РМЖ – рак молочной железы
РФЛП – радиофармацевтический лекарственный препарат
РХВ – радиохимический выход
РХЧ – радиохимическая чистота
ТСХ – тонкослойная хроматография
ЭДДА – этилендиаминдиуксусная кислота
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота