Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН
Чернов Владимир Иванович
доктор фармацевтических наук, доцент
Ларькина Мария Сергеевна

Томск – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15
1.1 Рецептор эпидермального фактора роста HER2 15
1.2 Радионуклиды, применяемые для молекулярной визуализации HER2 18
1.3 Таргетные молекулы для радионуклидной визуализации HER2 24
1.4 Радиофармпрепараты на основе DARPins, меченных ^{99m}Tc 32
Заключение по обзору литературы 38
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 40
2.1 Характеристика и синтез белков 40
2.2 Клеточные линии и условия их культивирования 43
2.3 Экспериментальные животные 44
2.4 Методики способов получения, контроля качества и оценки стабильности вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами, меченных технецием-99м 44
2.5 Методики способов получения, контроля качества и оценки стабильности вариантов DARPin G3 с HYNIC-хелатором, меченных технецием-99м 46
2.6 Методика способа получения и контроля качества радиокомплекса [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3$-(HE)$_3$-DARPin G3 48
2.7 Методики изучения функциональной пригодности радиокомплексов *in vitro* 49
2.8 Изучение биораспределения и таргетных свойств *in vivo* 51
2.9 Методики способа получения и контроля качества набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-(G$_3$S)$_3$C, ^{99m}Tc» 53
2.10 Методики получения и контроля качества готового РФЛП «DARPin G3-(G$_3$S)$_3$C, ^{99m}Tc» 58
2.11 Анализ и статистическая обработка данных 59
ГЛАВА 3 ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПРИГОДНОСТИ РАДИОКОМПЛЕКСОВ ВАРИАНТОВ DARPIN G3 61
3.1 Получение и восстановление вариантов DARPin G3, конъюгация с HYNIC хелатором 61
3.2 Получение ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с пептидными хелаторами и определение их стабильности 65
3.3 Получение ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором и определение их стабильности 71
3.4 Получение радиокомплекса [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3$-(HE)$_3$-DARPin G3 76

3.5 Результаты изучение *in vitro* ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с пептидными хелаторами 77
3.6 Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств *in vivo* ^{99m}Tc-комплексов с DARPin G3 с пептидными хелаторами....82
3.7 Результаты изучения *in vitro* ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на С-конце 90
3.8 Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на С-конце....95
3.9 Результаты изучение *in vitro* ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на N-конце 103
3.10 Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на N-конце 106
ГЛАВА 4 фармацевтическая разработка РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc»....114
4.1 Разработка состава и способы получения набора и готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» из него 117
4.2 Оценка функциональной пригодности химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в составе набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» 122
4.3 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» 127
4.4 Оптимизация методики определения радиохимических примесей готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» 134
4.5 Результат анализа стерильности и апирогенности 136
4.6 Результаты исследования острой токсичности....137
4.7 Разработка проекта фармакопейной статьи на таргетный РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» 138
Результаты клинической апробации РФЛП [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ 139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ....142
ВЫВОДЫ....146
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, ТЕРМИНОВ....149
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 151
ПРИЛОЖЕНИЕ А....174
ПРИЛОЖЕНИЕ Б 186
ПРИЛОЖЕНИЕ В....189
ПРИЛОЖЕНИЕ Г 194

ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....201
ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....204
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж.....218
ПРИЛОЖЕНИЕ З.....220

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. Рак молочный железы (РМЖ) является наиболее распространенным видом заболевания среди женского населения и составляет около 20% всех онкологических заболеваний у женщин [2]. Особое клиническое значение имеет гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста второго типа (HER2) на мембране клеток, которая выявляется у 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 [3, 4]. 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 [5, 6]. При злокачественной трансформации амплификация гена ERBB2 вызывает гиперэкспрессию HER2на мембране клеток. Избыток рецепторов ведет к нарушению сигнальных путей за счет патологического образования димеров ERBB, что подавляет апоптоз, усиливает пролиферацию и определяет агрессивный фенотип опухоли [7–10].

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 [11–14]. Отбор пациентов основан на определении HER2-статуса опухоли, для чего рутинно используют

иммуногистохимию и гибридизацию *in situ*. К числу наиболее значимых недостатков относятся: инвазивный характер исследования, отсутствие возможности одномоментной оценки распространенности опухолевого процесса, внутриопухолевая гетерогенность, а также вероятность расхождения HER2-статуса между первичной опухолью и метастатическими очагами [15, 16].

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), опциальным 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 [6]. 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 [17–19].

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.

Полученные результаты показали, что DARPin G3, содержащий гистидил-глутаматную последовательность ($(HE)_3$) на N-конце, меченный технецием-99м, обеспечивает надежную 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 [20].

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 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 для визуализации метастазов в этом органе. В рамках дальнейшей оптимизации был клинически исследован препарат [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3$-(HE)$_3$-DARPin G3 [21], который подтвердил безопасность и хорошую переносимость, обеспечивал надежную 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 [20]. Были разработаны и клинически оценены зарубежные каркасные белки – ADAPT6 и аффибоди. 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 и 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 цистеинсодержащими 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 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).

Впервые установлено отсутствие побочных реакций и нежелательных явлений у больных РМЖ после внутривенного введения [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ и рассчитаны поглощенные дозы радиации в органах и тканях после однократного введения.

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 радиофармацевтических лекарственных препаратов на основе DARPin и перспективность применения 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

радиохимическим выходом 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). Внутривенное введение [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ не вызывало побочных реакций и нежелательных явлений у больных РМЖ. Критическими органами при его использовании являются почки ((0,1262±0,0369) мГр/МБк). Эффективная доза облучения при инъекции РФЛП составляет около 5 мЗв, что сопоставимо с эффективными дозами при большинстве диагностических радионуклидных исследований.

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* проводилась 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 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 линкеры G_3C, E_3C или $(G_3S)_3C$ позволят получить соединение с высокой радиохимической чистотой. Радиокомплексы ^{99m}Tc с вариантами DARPin G3 с пептидными хелаторами превосходят по стабильности и радиохимическому выходу 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 фармакопейной статьи 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). Внутривенное введение разработанного РФЛП не вызывает побочных реакций и нежелательных явлений у больных РМЖ, эффективная доза облучения при его использовании составляет около 5 мЗв.

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 молодежный 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 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы, приложений. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 47 рисунками, содержит 8 приложений. Библиография включает 162 источника, из них 9 отечественных, 153 зарубежных.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Рецептор эпидермального фактора роста HER2

Онкологические заболевания продолжают занимать одно из ведущих мест среди причин смертности во всем мире. По данным ВОЗ и International Agency for Research on Cancer в 2022 году в мире было зарегистрировано около 20 млн новых случаев злокачественных образований, при этом число летальных исходов достигало 10 млн. Значительную долю в общей структуре онкологической заболеваемости составляет рак молочной железы, на который приходится 11,5 % всех случаев, что соответствует 2,3 млн пациентов [22]. В Российской Федерации, ссогласно данным МНИОИ им. П.А. Герцена, в 2022 году было выявлено 624,5 тыс. новых случаев злокачественных новообразований, при общем числе умерших 295,5 тыс. человек. РМЖ остается ведущей онкологической патологией женского населения. Ежегодно диагностируется около 74,6 тыс. новых случаев (21 % от всех злокачественных новообразований у женщин), а число смертей достигает 22,8 тыс. случаев в год [23].

Отдельного внимания заслуживает HER2-позитивный подтип рака молочной железы, который определяется повышенной экспрессией рецептора эпидермального фактора роста второго типа HER2. Гиперэкспрессия HER2, либо амплификация гена ERBB2 обнаруживается у 15 – 20 % пациенток с РМЖ и ассоциируется с агрессивным течением, высокой частотой рецидивов и неблагоприятным прогнозом [24, 25]. Вместе с тем наличие данного молекулярного маркера является показанием к назначению таргетной терапии, направленной на блокирование HER2-опосредованных сигнальных путей. Лекарственные препараты, направленные на ингибирование HER2-опосредованных опухолевых процессов, применяются как в виде монотерапии, так и в составе комбинированных схем с химиотерапевтическими средствами. К числу наиболее широко применяемых анти-HER2агентов относятся

моноклональные антитела (трастузумаб, пертузумаб), низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ (лапатиниб) и конъюгаты антител с цитотоксическими препаратами (трастузумаб эмтанзин, трастузумаб дерукстекан) [26 – 30]. Эффективность перечисленных препаратов напрямую зависит от достоверного определения HER2-статуса опухоли, который становится ключевым фактором выбора лечебной тактики [31].

В настоящее время для определения статуса HER2 разработан ряд методик, которые позволяют оценить экспрессию маркера на уровне белка, а также выявлять изменения на уровне ДНК и РНК. Наибольшее клиническое распространение получили методы, одобренные Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США, в частности, иммуногистохимическое исследование (ИГХ) и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). ИГХ позволяет определить уровень экспрессии белка HER2 на поверхности опухолевых клеток по четырех балльной шкале (0, 1+, 2+, 3+), тогда как FISH выявляет амплификацию гена ERBB2. Каждый из указанных методов обладает определенными достоинствами и ограничениями, что обуславливает отсутствие единого подхода к выбору оптимальной методики определения HER2-статуса при раке молочной железы [32].

Несмотря на широкую доступность и сравнительно невысокую стоимость, результаты ИГХ в значительной степени зависят от множества факторов. К наиболее значимым относятся особенности подготовки тканевого материала (продолжительность фиксации и используемый фиксатор), характеристика используемых антител (производитель, клон), а также уровень подготовки лабораторного персонала. Особую проблему представляет интерпретация полученных данных пограничных случаев с уровнем экспрессии 2+: эта категория считается неопределенной и требует обязательного подтверждения методом FISH, однако межлабораторная воспроизводимость ИГХ для образцов 2+ остается низкой [33]. Субъективность полуколичественной визуальной оценки дополнительно увеличивает риск ошибочной стратификации пациентов,

что может привести к необоснованному назначению дорогостоящей таргетной терапии либо, напротив, к отказу от нее.

Метод FISH, является «золотым стандартом» определения амплификации гена ERBB2, в меньшей степени подвержен влиянию преаналитических факторов, однако требует специализированного оборудования, высокой квалификации персонала и также имеет зону неопределенности (соотношение сигналов HER2/CEP17 от 1,8 до 2,2 либо среднее число копий гена от 4,0 до 5,9). Кроме того, оба метода – ИГХ и FISH – основаны на анализе биопсийного или операционного материала, который отражает состояние лишь ограниченного участка опухоли и не позволяет оценить всю ее гетерогенность. Между тем внутри- и межопухолевая гетерогенность экспрессии HER2 хорошо документирована: в разных регионах одной и той же опухоли, а также между первичным очагом и метастазами уровень экспрессии и амплификации может существенно различаться. Биопсия единичного участка неизбежно приводит к ошибкам выборки, недооценке истинного статуса и, как следствие, к ошибочным клиническим решениям. Наконец, инвазивный характер биопсии ограничивает возможность динамического мониторинга изменений HER2-статуса в процессе лечения и при прогрессировании заболевания.

Перечисленные ограничения привели к разработке неинвазивных методов оценки HER2-статуса, способных охватывать весь объем опухолевой ткани и обеспечивать возможность повторных исследований. В этом контексте особое место занимают методы радионуклидной диагностики – однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), которые позволяют визуализировать распределение таргетных радиофармацевтических препаратов в организме и количественно оценивать экспрессию рецепторов. Применение таргетных РФЛП, специфически связывающихся с HER2, дает возможность неинвазивно выявлять все очаги, включая труднодоступные для биопсии метастазы, проводить одномоментную оценку гетерогенности, а также отслеживать изменения экспрессии в динамике на фоне терапии. Более того, количественные показатели накопления РФЛП в

опухоли, такие как стандартизованный уровень накопления (SUV) или отношение опухоль/фон, могут служить предиктивными маркерами ответа на лечение [34].

Однако создание эффективного РФЛП для визуализации HER2 требует решения комплекса взаимосвязанных задач: выбора оптимального радионуклида, обеспечивающего баланс между периодом полураспада, энергией излучения и радиационной нагрузкой; дизайна высокоаффинной таргетной молекулы, способной быстро проникать в опухоль и быстро выводиться из нормальных тканей; и разработки надежного метода введения радионуклида в структуру адресной молекулы без потери ее биологической активности.

1.2 Радионуклиды, применяемые для молекулярной визуализации HER2

Радионуклид, предназначенный для молекулярной визуализации рецептора HER2, должен удовлетворять нескольким критериям [35]. Прежде всего, период его физического полураспада должен соответствовать времени, необходимому таргетной молекуле для достижения максимального накопления в опухоли и выведения из нормальных тканей. Слишком короткий период полураспада не позволит дождаться оптимального соотношения «опухоль/фон», тогда как избыточно долгий приведет к неоправданно высокой радиационной нагрузке на пациента. Во-вторых, энергия испускаемого излучения должна обеспечивать эффективную регистрацию детекторами (гамма-камерами для ОФЭКТ либо ПЭТ-сканерами) и в то же время быть достаточно низкой, чтобы минимизировать дозу облучения [36]. В-третьих, радионуклид должен быть доступен в клинических условиях – либо через генераторную систему, либо путем регулярных поставок с циклотронного производства [37]. Наконец, химия радионуклида должна допускать его стабильное введение в структуру таргетной молекулы без нарушения ее биологической активности.

В исследованиях по визуализации HER2 применялся ряд радионуклидов, различающихся физическими и химическими свойствами.

^{89}Zr (T½ = 78,4 ч, β^+-излучатель, Eβ^+ = 0,902 МэВ) благодаря длительному периоду полураспада хорошо сочетается с медленной фармакокинетикой полноразмерных антител, позволяя проводить ПЭТ-исследования через несколько суток после введения. Однако это же свойство обуславливает высокую эффективную дозу облучения – около 0,5–1,5 мЗв/МБк, что примерно в 20 раз выше, чем для короткоживущих радионуклидов [38]. Кроме того, неспецифическое накопление свободного ^{89}Zr в костной ткани создает дополнительный фоновый сигнал, затрудняющий определение костных метастазов.

^{64}Cu (T½ = 12,7 ч, β^+-излучатель, Eβ^+ = 0,653 МэВ) занимает промежуточное положение: период полураспада короче, чем у ^{89}Zr, но достаточно длителен для мечения антител [39]. Проблемой является накопление свободной меди в печени, что повышает фоновый сигнал и может маскировать метастазы в этом органе.

^{68}Ga (T½ = 68 мин, β^+-излучатель, Eβ^+ = 1,899 МэВ) получают из генератора ^{68}Ge/^{68}Ga, что обеспечивает удобство клинического применения. Короткий период полураспада идеально согласуется с быстрой фармакокинетикой малых таргетных молекул (аффибоди, наноантитела), однако ограничивает возможности синтеза, контроля качества и логистики [40].

^{18}F (T½ = 109,8 мин, β^+-излучатель, Eβ^+ = 0,634 МэВ) широко используется в ПЭТ-диагностике, однако его введение в белковые молекулы требует многостадийного синтеза с использованием простетических групп, что усложняет процедуру получения радиофармпрепарата.

^{111}In (T½ = 2,8 сут., γ-излучатель, Eγ = 171 и 245 кэВ) применяется для ОФЭКТ-визуализации, однако длительный период полураспада повышает радиационную нагрузку, а энергия гамма-квантов не полностью оптимальна для стандартных гамма-камер [41].

На этом фоне ^{99m}Tc выделяется совокупностью характеристик, делающих его одним из наиболее востребованных радионуклидов в диагностической ядерной медицине [42].

Период полураспада ^{99m}Tc составляет 6,02 ч. Это значение достаточно велико для проведения синтеза, контроля качества, введения препарата и накопления изображения, но достаточно мало, чтобы радиационная нагрузка на пациента оставалась низкой – эффективная доза для ^{99m}Tc-меченых таргетных препаратов обычно составляет 0,010 – 0,030 мЗв/МБк [43]. Шестичасовой период полураспада идеально согласуется с фармакокинетикой малых таргетных молекул (аффибоди, ADAPT, DARPins), которые достигают максимального накопления в опухоли через 2 – 4 ч после введения и быстро выводятся из нормальных тканей [42].

Технеций-99м испускает гамма-кванты с энергией 140 кэВ. Это излучение регистрируется стандартными гамма-камерами с эффективностью более 90 % при использовании кристаллов толщиной ½ дюйма и обладает хорошей проникающей способностью в тканях (слой половинного ослабления около 4,6 см), что обеспечивает получение качественных сцинтиграфических и ОФЭКТ-изображений [44]. Отсутствие корпускулярного излучения (β^-- или α-частиц) минимизирует нежелательное облучение здоровых тканей [42].

Широкое клиническое применение ^{99m}Tc стало возможным благодаря генераторам ^{99}Mo/^{99m}Tc, разработанным в начале 1960-х годов. Материнский радионуклид ^{99m}Mo (T½ = 66 ч) фиксирован на хроматографической колонке из оксида алюминия; при элюировании физиологическим раствором образуется натрия пертехнетат ([^{99m}Tc]TcO_4^-) высокой радиохимической чистоты. Транзиентное равновесие между ^{99}Mo и ^{99m}Tc наступает примерно через 23 – 24 ч после предыдущего элюирования, что позволяет проводить ежедневное получение радионуклида в течение всего срока службы генератора [37]. Генераторная схема исключает зависимость от локального циклотрона и обеспечивает доступность ^{99m}Tc для широкого круга медицинских учреждений. По данным МАГАТЭ, ^{99m}Tc остается наиболее широко используемым

радионуклидом в диагностической ядерной медицине: ежедневно в мире с его применением выполняется около 40 тыс. процедур [45].

Также немаловажным фактором является развитая координационная химия технеция, обусловленная способностью существовать в нескольких степенях окисления от +1 до +5 и образовывать комплексы с разнообразными лигандами, что позволяет гибко подбирать условия мечения для широкого круга таргетных молекул [46]. Это свойство имеет ключевое значение для визуализации HER2, где в качестве векторов используются как антитела и их фрагменты, так и скаффолды.

В радиофармацевтической химии идентифицировано несколько ключевых неорганических функциональных групп, называемых «ядрами» или «металлическими фрагментами», каждая из которых обладает специфическими координационными свойствами и определяет биологическое поведение конечного препарата.

Монооксо $[^{99m}Tc][TcO]^{3+}$ и диоксо $[^{99m}Tc][TcO_2]^{+}$ ядра

Среди всех степеней окисления технеция пятивалентный технеций-99м является наиболее изученным и применяемым в радиофармацевтической химии. ^{99m}Tc (V)-содержащих РФЛП в клиническом применении содержат ядро $[^{99m}Tc][TcO]^{3+}$ (например, ^{99m}Tc-HMPAO; ^{99m}Tc-MAG_3), есть примеры успешных РФЛП, соответствующих комплексу с кором транс-$[^{99m}Tc][TcO_2]^{+}$ (^{99m}Tc-Tetrofosmin) [47, 48]. Эти комплексы характеризуются квадратно-пирамидальной геометрией с апикально расположенной оксо-группой и четырьмя координационными позициями, занятыми преимущественно азот- и серосодержащими лигандами [49].

Среди классических координационных систем особое место занимают тетрадентатные лиганды класса $N_{4-x}S_x$, включая диамино-дитиолы (DADT), диамидо-дитиолы (DADS), моноамино-моноамидо-дитиолы (MAMA) и пептидный хелатор MAG3 [50 – 52]. Эти системы демонстрируют принципиальные различия в физико-химических свойствах формируемых комплексов: тогда как DADT и MAMA образуют нейтральные липофильные

соединения, DADS и MAG3 дают анионные комплексы с выраженным почечным клиренсом.

Короткие цистеин содержащие пептиды, такие как GGGC, EEEC, GGGSC, GAGG и др., которые сочетают преимущества классической N/S-координации с дополнительными возможностями молекулярного дизайна [53]. Особый интерес представляет возможность тонкой регуляции координационных свойств за счет варьирования аминокислотного окружения тиольной группы, что открывает новые перспективы для создания высокоспецифичных радиофармпрепаратов.

Гидразино-технеций [^{99m}Tc][Tc-HYNIC] ядро

Впервые о возможности использования 6-гидразиноникотинамида (HYNIC) в качестве хелатора для мечения технецием-99м упомянул профессор Абрамс в 1997 г [54]. Первоначально метод был апробирован на поликлональном IgG, а впоследствии адаптирован для мечения широкого спектра структур, включая фрагменты антител, пептидные соединения, аналоги соматостатина и лиганды к ПСМА [55 – 57], став самым популярным хелатирующим агентом для мечения ^{99m}Tc на сегодняшний день.

Особенностью HYNIC является его способность занимать ограниченное число координационных позиций в комплексе с технецием, что требует применения вспомогательных солигандов, таких как трицин, ЭДДА или глюкогептонат. Эти соединения не только стабилизируют координационную сферу радионуклида, но и позволяют модулировать гидрофильность и фармакокинетику конечного препарата, что наглядно продемонстрировано в исследованиях биораспределения. Ключевым преимуществом HYNIC-опосредованного мечения остается высокая эффективность процесса, достигающая 95% выхода, а также универсальность подхода, позволяющего работать с разнородными биологическими мишенями. Однако метод не лишен существенных ограничений: склонность комплексов к диссоциации *in vivo*, образование смесей диастереомеров и необходимость тщательной оптимизации состава для каждой конкретной молекулы. Нестабильность структуры может

приводить к неконтролируемому высвобождению радионуклида, а наличие стереоизомеров усложняет стандартизацию препаратов.

Карбонильное ядро $[^{99m}Tc][Tc(CO)_3]^{1+}$

Металлоорганическое ядро $[^{99m}Tc][Tc(CO)_3]^+$, состоящее из технеция(I), координированного тремя карбонильными лигандами, представляет собой стабильную структуру, широко используемую для создания радиофармпрепаратов. Его синтез осуществляется в одну стадию из генераторного пертехнетата ($[^{99m}Tc][TcO_4]^-$) с применением боранокарбоната калия ($K_2[BH_3CO_2]$) в качестве восстановителя и источника карбонильных лигандов [58]. Образующийся предшественник $[^{99m}Tc][Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ содержит три молекулы воды, что позволяет вводить би- или тридентатные лиганды с донорными атомами азота, формируя гетеролептические комплексы, такие как $[^{99m}Tc][Tc(CO)_3(L)Cl]$.

Особый интерес представляет использование гистидина, демонстрирующего высокое сродство к $[^{99m}Tc][Tc(CO)_3]^+$ даже при низких концентрациях (10^{-5}–10^{-6} М). Модификация этой аминокислоты путем введения карбоксиметильной группы позволяет создавать конъюгаты с биомолекулами, обеспечивая одноэтапное мечение технецием непосредственно из пертехнетата. Однако in vivo частичное замещение лигандов белками плазмы приводит к изменению фармакокинетики, увеличивая накопление препарата в печени и почках [59]. Перспективы использования $[^{99m}Tc][Tc(CO)_3]^+$-комплексов связаны с их универсальностью, простотой синтеза и возможностью тонкой настройки гидрофильно-липофильного баланса. Современные исследования сосредоточены на разработке лигандов с улучшенной стабильностью *in vivo* и селективностью, что открывает новые возможности для создания высокоэффективных диагностических и тераностических агентов.

Следует подчеркнуть, что реализация преимуществ ^{99m}Tc в полной мере становится возможной именно при использовании таргетных молекул малой массы, чья быстрая фармакокинетика (максимальное накопление в опухоли через 2–4 ч) согласуется с шестичасовым периодом полураспада радионуклида

[60]. Эта взаимосвязь между выбором радионуклида и дизайном таргетной молекулы является центральной для современных исследований по визуализации HER2.

1.3 Таргетные молекулы для радионуклидной визуализации HER2

Разработка средств молекулярной визуализации злокачественных новообразований основана на создании таргетных РФЛП. Согласно ОФС ГФ XV, «Радиофармацевтический лекарственный препарат (РФЛП) – лекарственный препарат, содержащий в готовом для применения состоянии один или несколько радионуклидов (радиоактивных изотопов) в качестве действующего вещества или в составе действующего вещества». В качестве химических предшественников для получения РФЛП используют два основных типа соединений: низкомолекулярные вещества органической или неорганической природы и высокомолекулярные биологические структуры, включая моноклональные антитела, их фрагменты, каркасные белки и пептиды [34]. Для обеспечения стабильности и воспроизводимости радиохимического синтеза указанные субстанции применяют в сочетании со вспомогательными веществами, такими как буферные системы, стабилизаторы и консерванты, которые, как правило, входят в состав лиофилизированных наборов, выпускаемых в одно- или двух флаконном формате.

Современные подходы к радиофармацевтике направлены на создание таргетных РФЛП на основе адресных молекул, обеспечивающих селективную доставку радионуклида к опухолевым клеткам при минимальном накоплении в здоровых тканях [34]. Химические предшественники для получения таргетных РФЛП могут содержать в своей структуре дополнительные функциональные элементы – линкеры, бифункциональные хелатирующие агенты и простетические группы. Такие модификации вводят для оптимизации

фармакокинетических характеристик готового препарата, повышения стабильности *in vivo* и улучшения соотношения «опухоль/фон» [61].

Моноклональные антитела. Первоначально в качестве векторов для визуализации рецептора HER2 применяли полноразмерные моноклональные антитела – трастузумаб и пертузумаб. В двух взаимосвязанных исследованиях Ulaner и соавт. изучали возможность выявления HER2-позитивных метастазов у пациентов с HER2-негативным первичным раком молочной железы с помощью ПЭТ с [^{89}Zr]Zr-трастузумаб [62, 63]. Суммарно в исследованиях участвовали 20 пациентов. Чувствительность метода оказалась низкой: HER2-позитивные метастазы были корректно идентифицированы лишь у 15% пациентов, при этом в 30% случаев зарегистрированы ложноположительные результаты. Причины таких показателей остаются не до конца выясненными; среди возможных факторов обсуждаются внутри- и межопухолевая гетерогенность, ошибки патологоанатомического отбора образцов, неспецифическое накопление свободного циркония-89 (особенно проблематичное для костных метастазов), а также быстрая интернализация трастузумаба и пертузумаба в сочетании с длительным временем сканирования, необходимым для достижения оптимального соотношения сигнал/шум при использовании меченых антител.

Помимо препаратов на основе циркония-89, для визуализации экспрессии HER2успешно применяются их аналоги, меченные медью-64. Доклиническое сравнение [^{89}Zr]Zr-DFO-трастузумаба и [^{64}Cu]Cu-DOTA-трастузумаба показало более высокое накопление в опухоли для циркониевого конъюгата, однако из-за повышенного фонового сигнала соотношение «опухоль/нормальные ткани» для двух радиофармпрепаратов оказалось сопоставимым [64]. Первое клиническое исследование [^{64}Cu]Cu-DOTA-трастузумаба, проведенное Tamura и соавт. (2013) с участием шести пациентов с раком молочной железы, продемонстрировало способность визуализировать первичные опухоли и мозговые метастазы размером до 2×2 см; оптимальным временем сканирования признали 48 ч после инъекции [65].

Параллельно предпринимались попытки улучшить стабильность антительных радиофармпрепаратов путем модификации хелатирующих агентов. Замена стандартного десферриоксамина (DFO) на его производное DFO* при мечении трастузумаба и пертузумаба ^{89}Zr позволила значительно снизить накопление радиоактивности в печени и костях за счет повышения стабильности комплекса, не изменяя общую фармакокинетику, время циркуляции в крови и накопление в опухоли [66]. Аналогично, для препаратов на основе меди-64 замена хелатора DOTA на NOTA привела к снижению печеночного накопления *in vivo* у [^{64}Cu]Cu-NOTA-трастузумаба по сравнению с [^{64}Cu]Cu-DOTA-трастузумаба [63, 67]. Однако Толмачев и соавт. [68] пришли к выводу, что NOTA и его производное NODAGA являются субоптимальными хелаторами для меди, указав на возможность высокой реабсорбции конъюгатов в почках и перераспределения радиометаболитов как на причину неоптимального биораспределения.

Фрагменты антител. Следующим направлением исследований стало уменьшение размера таргетной молекулы. Протеолитические фрагменты трастузумаба и пертузумаба (Fab и F(ab')$_2$ соответственно) в целом демонстрируют сниженное накопление в опухоли по сравнению с полноразмерными антителами, что объясняется их ускоренным почечным клиренсом и сниженной биодоступностью [67, 69, 70]. Вместе с тем быстрое выведение позволяет достигать хорошей контрастности изображения уже через 24 ч после введения. Lam и соавт. показали, что [^{64}Cu]Cu-NOTA-пертузумаб F(ab')$_2$ способен выявлять изменения экспрессии HER2, индуцированные терапией трастузумабом, в доклинической модели [71]. Mendler и коллеги исследовали пегилированный Fab-фрагмент трастузумаба, меченный ^{89}Zr и ^{124}I. Оба варианта обеспечили сопоставимый контраст и качественную визуализацию ксенотрансплантатов через 24 ч, хотя накопление варианта с ^{124}I было ниже [72].

Одноцепочечные вариабельные фрагменты, диаболи, миниболи и однодоменные антитела. Дальнейшее уменьшение адресных молекул включало создание одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), их димерных форм

(диаподи), минибоди и однодоменных антител (sdAb). Первые scFv, нацеленные на HER2, характеризовались низким накоплением в опухоли (0,7 – 1% ВД/г), что, возможно, было связано с методикой йодирования, не обеспечивающей остаточного удержания в клетке [73, 74]. Кроме того, математическое моделирование указывает, что глобулярные белки массой около 25 кДа имеют наихудший потенциал накопления в опухоли [74]. Несмотря на низкое поглощение, для этих зондов зарегистрированы высокие соотношения опухоль/кровь (9 – 15).

Димерные форматы (диаподи) позволяли увеличить накопление в ксенотрансплантатах в 2 – 2,7 раза и достичь еще более высоких соотношений опухоль/кровь, опухоль/печень и опухоль/кость по сравнению с мономерами [75, 76]. Применение хелатора Df-p-SCN при мечении ^{68}Ga значимо увеличивало поглощение опухолью по сравнению с [^{125}I]I-scFv, хотя тканевые соотношения были ниже [77]. Среди производных scFv наилучшие характеристики для визуализации HER2показали диаподи и миниатюрные антитела, меченные ^{111}In [78], однако их общие возможности были оценены как ограниченные в сравнении с другими фрагментами и каркасными белками.

Значительный шаг вперед обеспечили однодоменные антитела. Несколько sdAb, нацеленных на HER2, были помечены радиоактивными изотопами и оценены в качестве зондов [79, 80]. Наиболее перспективным оказался клон 2Rs15d (позднее названный anti-HER2-VHH1) [81], накопление которого в ксенотрансплантатах SKOV-3 и BT474 составляло 4 – 19% ВД/г уже через 1 – 3 ч после введения [56, 82, 83]. Быстрое и высокое накопление позволило эффективно использовать для мечения короткоживущие радионуклиды – ^{18}F [83, 84], ^{68}Ga [80], ^{99m}Tc [80] и ^{131}I [82], обеспечивая лучшее соотношение опухоль/кровь через несколько часов, чем меченые трастузумаб или пертузумаб через несколько дней. Накопление sdAb в почках было повышенным, особенно для остаточных меток, однако этот эффект, по-видимому, можно уменьшить удалением гексагистидинового тега [80].

В клинических испытаниях исследованы два варианта на основе 2Rs15d: [^{68}Ga]Ga-HER2-нанотело [85] и [^{131}I]I-GMIB-анти-HER2-VHH1 [82]. В исследовании фазы I [^{68}Ga]Ga-HER2-нанотела с участием 10 пациентов с метастатическим раком молочной железы препарат показал хорошую переносимость и способность визуализировать экспрессию HER2 в первичных опухолях и метастазах. Из-за быстрого клиренса из нормальных тканей 90-минутный интервал был рекомендован как оптимальный для визуализации, несмотря на высокое накопление в почках, обусловленное почечной экскрецией [85].

Каркасные белки (скаффолды). Помимо фрагментов антител, для визуализации HER2 были разработаны три класса каркасных белков: аффибоди, ADAPT и DARPins. Эти белки сконструированы на основе природных структур: так, аффибоди является модифицированной версией Z-домена белка A, который связывается с иммуноглобулинами G; ADAPT создан на основе альбумин-связывающего домена белка G стрептококка; DARPin создан на основе природных белков, содержащих анкириновые повторы, которые широко распространены у эукариот (включая человека) и играют важную роль в клеточных процессах, таких как белок-белковые взаимодействия. Доклинические и клинические исследования показали их высокую эффективность как таргетных молекул для диагностики HER2-позитивных опухолей [86 – 90]. Наиболее изученными представителями являются аффибоди ZHER2:342 (и ее производные), ADAPT6 и DARPin G3.

Важной особенностью перечисленных скаффолдов является медленная интернализация в опухолевых клетках [87, 91, 92]. Для эффективного удержания в опухоли необходимы чрезвычайно высокое сродство и низкая скорость диссоциации. Наивысшие зарегистрированные значения сродства (K_D) для аффибоди ZHER2:342, ADAPT6 и DARPin G3 составляют 29 пМ [93], 2,5 нМ [87] и 90 пМ [94] соответственно. Несмотря на то, что сродство ADAPT6 лежит в низком наномолярном диапазоне, исследования аффибоди показали, что такого сродства достаточно для эффективного захвата опухолью в течение 4 ч для

мишеней с высокой экспрессией [95]. Димеризация скаффолдов, как было показано, увеличивает аффинность, но не приводит к росту общего накопления в опухоли как для аффибоди, так и для ADAPT [96, 97], что аналогично наблюдениям для scFv и $(scFv)_2$.

Аффибоди ZHER2:342 является наиболее изученным клоном в доклинических исследованиях. Ее синтетический вариант ABY002, конъюгированный с DOTA и меченный ^{111}In и ^{68}Ga, прошел пилотное клиническое исследование с участием трех пациентов с метастатическим раком молочной железы [97]. Была подтверждена безопасность и способность [^{111}In]In- и [^{68}Ga]Ga-ABY002 выявлять HER2-позитивные метастазы уже через 2 – 3 ч после введения. Удалось обнаружить 9 из 11 метастазов, ранее визуализированных с помощью [^{18}F]ФДГ-ПЭТ, что превосходит результаты первых исследований с [^{111}In]In-DTPA-трастузумабом [98]. Помимо ожидаемого высокого накопления в почках, неожиданно высоким оказалось накопление в печени, не предсказанное доклиническими моделями.

Дальнейшая оптимизация ZHER2:342, включавшая замену 11 поверхностных аминокислот, не участвующих в связывании, привела к созданию нового каркаса ABY025 (DOTA-ZHER2:2891) [99]. Препарат второго поколения ABY025, меченный ^{111}In, был использован для ОФЭКТ-визуализации у 7 пациентов с раком молочной железы [100]. Повышенное накопление наблюдалось даже в некоторых клинически HER2-негативных очагах. Накопление в HER2-позитивных очагах увеличивалось со временем, и соотношение показателей через 24 и 4 ч было предложено в качестве диагностического критерия для дифференциации клинически HER2-позитивных и негативных поражений. Кроме того, [^{111}In]In-DOTA-ABY025 позволил четко визуализировать некоторые HER2-позитивные метастазы, не обнаруженные ранее с помощью [^{18}F]ФДГ-ПЭТ. В другом исследовании [^{68}Ga]Ga-ABY025 продемонстрировал корреляцию между SUV в очагах и уровнем экспрессии HER2 по данным ИГХ, отличную воспроизводимость результатов ПЭТ и влияние вводимой дозы пептида на качество изображения [86]. Увеличение дозы

за счет добавления немеченого ABY025 снижало фоновое накопление в печени и улучшало визуализацию печеночных метастазов. По результатам сканирования с [^{68}Ga]Ga-ABY-025 план лечения был изменен у 3 из 16 пациентов. Эффективная доза облучения составила 0,028 мЗв/МБк, что примерно в 20 раз ниже, чем для моноклональных антител, меченных ^{89}Zr [101, 102]. В настоящее время продолжается многоцентровое исследование II/III фазы [^{68}Ga]Ga-ABY025 (NCT03655353).

Модифицированная аффибоди MZHER2:342, содержащая N-концевой линкер Cys-Gly-Gly-Gly-Arg-Asp-Asn для повышения гидрофильности и снижения абдоминального фона, была мечена с помощью [^{18}F]AlF-NOTA, ^{68}Ga и ^{89}Zr [103 – 105]. В доклинических исследованиях MZHER2:342 обеспечила четкую визуализацию ксенотрансплантатов SKOV3 и BT474 уже через 30 мин после введения. Оценка [^{68}Ga]Ga-NOTA-MAL-Cys-MZHER2:342 у двух пациентов с раком молочной железы показала возможность детекции HER2-позитивных поражений и предположительно более низкое накопление в печени по сравнению с [^{68}Ga]Ga-ABY025 и ABY002. В исследовании с участием 34 пациентов с раком желудка оптимальный контраст при визуализации достигался через 2 ч, при чувствительности 55% и специфичности 100% при пороговом значении SUV 6,6 [106].

В 2023 г. Bragina и соавт. опубликовали результаты клинического исследования I фазы препарата на основе аффибоди второго поколения ^{99m}Tc-ZHER2:41071, разработанного для ОФЭКТ-визуализации экспрессии HER2. В исследование был включен 31 пациент с первичным РМЖ, разделенный на три когорты (получавшие инъекции 500, 1000 или 1500 мкг ZHER2:41071). В каждой когорте было не менее 5 пациентов с высокой экспрессией HER2 (оценка ИГХ 3+ или 2+/FISH+) и 5 пациентов с низкой (оценка ИГХ 2+ или 1+ и FISH положительная) или отсутствующей экспрессией HER2 в опухоли.

Инъекции ^{99m}Tc-ZHER2:41071 переносились хорошо и не были связаны с побочными эффектами. Наибольшее накопление отмечалось в почках и печени. Эффективная доза облучения составила 0,019 ± 0,004 мЗв/МБк, что сопоставимо

или ниже, чем у других меченых аффибоди для ПЭТ. Оптимальной признана доза 1000 мкг: через 2 ч после инъекции она обеспечила наилучшую дифференциацию между HER2-положительными и HER2-низко/отрицательными опухолями (SUV_{max} 16,9 ± 7,6 против 3,6 ± 1,4, $p < 0,005$).

Накопление ^{99m}Tc-ZHER2:41071 в HER2-позитивных метастазах в лимфатических узлах (SUV_{max} 6,9 ± 2,4, n = 5) было значительно ($p < 0,05$) выше, чем в HER2-низко-/отрицательных лимфатических узлах (SUV_{max} 3,5 ± 1,2, n = 4). ^{99m}Tc-ZHER2:41071 визуализировал метастазы в печени у пациента с поражением печени [107].

В 2020 г. Bragina и соавт. опубликовали результаты первого клинического исследования ОФЭКТ с [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 у 29 пациентов с раком молочной железы [89]. Препарат хорошо переносился; эффективные дозы составили 0,009 ± 0,002 мЗв/МБк (500 мкг белка) и 0,010 ± 0,003 мЗв/МБк (1000 мкг). Доза 500 мкг была признана оптимальной и позволяла дифференцировать клинически HER2-положительные и HER2-отрицательные поражения уже через 2 ч после инъекции. У одной пациентки с помощью [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 были визуализированы костные метастазы, не обнаруженные при КТ или сцинтиграфии с [^{99m}Tc]Tc-пирофосфатом, что впоследствии подтвердилось МРТ.

Таким образом, опыт применения моноклональных антител и их фрагментов для визуализации HER2 выявил ограничения, связанные с медленной фармакокинетикой, неспецифическим накоплением и гетерогенностью экспрессии рецептора. Миниатюризация таргетных молекул и переход к высокоаффинным белковым каркасам позволили существенно сократить время исследования, улучшить соотношение «опухоль/фон» и снизить радиационную нагрузку, что делает аффибоди, ADAPT и DARPins перспективной платформой для создания диагностических тРФЛП нового поколения.

1.4 Радиофармпрепараты на основе DARPins, меченных ^{99m}Tc

DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins – белки на основе сконструированных анкириновых повторов) представляют собой искусственно сконструированные белки, основанные на повторяющихся анкириновых мотивах. Концепция каркасных белков была разработана исследовательской группой профессора Плюктуна и основана на использовании стабильного белкового шаблона, в котором определенные аминокислотные позиции могут варьироваться без нарушения общей пространственной организации молекулы. Такая архитектура позволяет создавать библиотеки белков, адаптированных для распознавания широкого спектра молекулярных целей [108 – 119].

Типичная молекула DARPin состоит из N- и C-концевых доменов и нескольких внутренних повторов, которые формируют вытянутую соленоидную правозакрученную архитектуру с гидрофильной поверхностью, пригодной для вариабельных аминокислотных замен. Вариабельные позиции формируют участок специфического связывания, тогда как гидрофобное ядро обеспечивает высокую стабильность и сохранение пространственной структуры [318]. Благодаря высокой аффинности к специфическим мишеням, выраженной структурной стабильности, хорошей растворимости и молекулярной массе 14 – 20 кДа (против ~150 кДа у IgG), DARPins рассматриваются как перспективная альтернатива антителам, в том числе для конъюгации с радиоактивными изотопами.

Ранее проведенные исследования показали возможность использования DARPins в качестве альтернативы антителам для определения экспрессии HER2 при раке молочной железы. Высокоаффинные DARPins, специфичные к HER2, продемонстрировали сопоставимую чувствительность и более высокую специфичность по сравнению с одобренным FDA моноклональным антителом при сопоставлении с «золотым стандартом» – флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH), что подтверждает их диагностическую ценность [120]. В связи с этим

особый интерес представляют низкомолекулярные DARPins, специфичные к HER2 и пригодные для радионуклидной визуализации.

Особый интерес представляет вариант G3 – низкомолекулярный белок с молекулярной массой 14 – 15 кДа и пикосекундным сродством к HER2 (91 пмоль/л) [121]. Он не обладает биологической активностью и связывается с HER2 в присутствии трастузумаба и пертузумаба *in vitro*, что делает его перспективным для диагностики и терапии при условиях проводимой HER2-терапии [94, 122]. В доклинических исследованиях [123] DARPin на основе G3 показал эффективное накопление и подавление роста ксенографтов, экспрессирующих HER2, а также отсутствие токсичности в проведенных клинических испытаниях [124].

Научным коллективом Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством академика С.М. Деева проводились работы по биосинтезу DARPin в России. Предложен способ детекции онкомаркера HER2 на поверхности опухолевых клеток с использованием таргетного флуоресцентного белка DARPin-mCherry [125].

Под руководством проф. В. Толмачева велись разработки радиотрейсеров на основе DARPin 9_29, DARPin $(HE)_3$-G3 и DARPin G3-(H_6), меченных ^{99m}Tc [21, 126]. DARPin G3, модифицированный гексагистидиновым тагом (His_6) и меченный ^{99m}Tc в форме трикарбонильного комплекса ($[^{99m}Tc(CO)_3]^+$), изучался в контексте визуализации HER2-позитивных опухолей в клеточных культурах и *in vivo*. Комплекс продемонстрировал стабильность в сыворотке крови и буферных растворах, однако параметры выхода и радиохимической чистоты не были детально охарактеризованы.

В отделении радионуклидной диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ проведены I и II фазы клинического исследования радиотрейсера на основе ^{99m}Tc-DARPin9_29 для визуализации рака молочной железы (РМЖ) с гиперэкспрессией HER2 [127 – 129].

В ходе I фазы (n=12) не зарегистрировано жалоб, изменений показателей сердечно-сосудистой системы, температуры тела или лабораторных параметров

в течение 48 ч наблюдения. Период полувыведения из крови составил 2,51 ч. Наибольшая поглощенная доза радиации отмечена в почках (0,12±0,02 мГр), надпочечниках (0,036±0,003 мГр) и селезенке (0,029±0,019 мГр). Умеренные значения зафиксированы в печени (0,015±0,004 мГр), желчном пузыре и поджелудочной железе (по 0,016±0,003 мГр). Минимальное накопление наблюдалось в головном мозге, яичниках и коже (0,002 – 0,003 мГр). Эффективная доза облучения составила 0,012±0,001 мЗв/МБк.

Индекс опухоль/фон у пациенток с гиперэкспрессией HER2 более чем в 2,5 раза превышал значения в группе с HER2-негативными опухолями ($p<0,05$, критерий Манна – Уитни). Наивысшее значение индекса (10,2 ± 1,2) регистрировалось через 2 ч после введения, что указывает на оптимальное время для визуализации (рисунок 1, 2) [127 – 129].

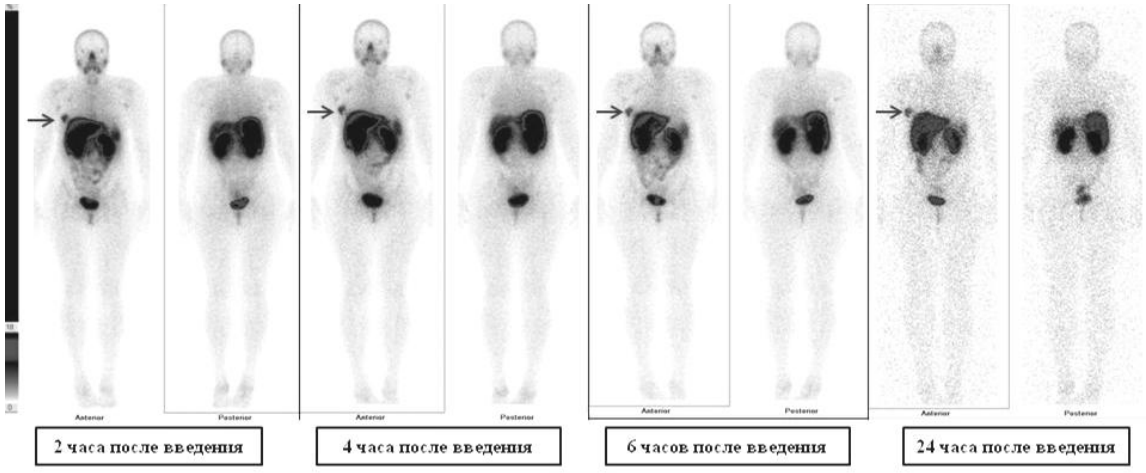


Рисунок 1 – Распределение радиотрейсера ^{99m}Tc-DARPin9_29 в органах и тканях у больной РМЖ с гиперэкспрессией HER2 через 2, 4, 6 и 24 часа после введения: передняя и задняя проекции (стрелками показана опухоль правой молочной железы) [127]

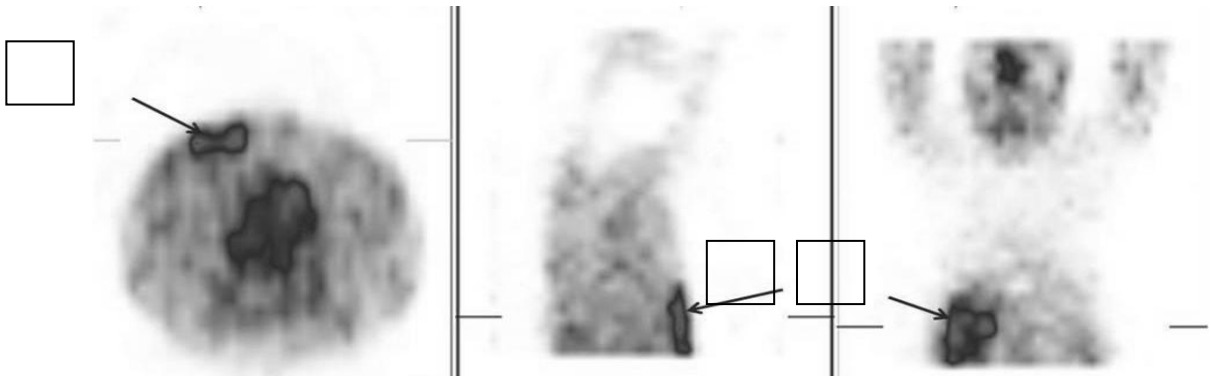


Рисунок 2 – Данные ОФЭКТ с ^{99m}Tc-DARPin9_29 в поперечной (1) и планарных проекциях (2,3) пациентки с позитивным статусом HER2 через 2 часа после введения: визуализация накопления индикатора в центральных отделах левой молочной железы (стрелки указывают на опухоль в левой молочной железе) [128]

Во II фазе исследования (n=8) с применением ОФЭКТ отсутствие побочных реакций подтвердилось. Данные ОФЭКТ через 2 ч после введения показали, что наибольшее процентное содержание от введенной дозы наблюдалось в печени (26,28%) и почках (6,68%), минимальное – в яичниках (0,09%) и матке (0,08%). Индекс опухоль/фон у пациенток с HER2-положительными опухолями был в 2,8 раза выше, чем в контрольной группе (8,2 ± 1,2 против 2,8 ± 0,34).

Дальнейшее развитие данного направления связано с клиническим исследованием радиотрейсера ^{99m}Tc-$(HE)_3$-G3. I фаза клинического исследования ^{99m}Tc-DARPin $(HE)_3$-G3 проведена с участием 29 пациенток с первичным раком молочной железы (не менее 5 HER2+ и 4 HER2- в каждой когорте), получавших дозы 1000, 2000 и 3000 мкг белка. Препарат хорошо переносился, не зарегистрировано изменений жизненных показателей, побочных реакций, отклонений в анализах крови и мочи. Период полувыведения из крови составил 3,5, 3,8 и 3,4 ч для доз 1000, 2000 и 3000 мкг соответственно. Органами с наибольшим поглощением активности были почки и печень; заметная активность также наблюдалась в легких, тонком кишечнике, слезных и слюнных железах. Важным результатом стало статистически значимое ($p < 0,05$) снижение

накопления в печени при дозах 2000 и 3000 мкг по сравнению с 1000 мкг. Визуализация с использованием 3000 мкг позволила различить HER2-положительные и HER2-отрицательные опухоли через 2, 4 и 6 ч после инъекции. У одной пациентки по результатам сцинтиграфии и повторного ИГХ/FISH-анализа статус был пересмотрен с отрицательного на положительный, что привело к назначению таргетной терапии (рисунок 3).

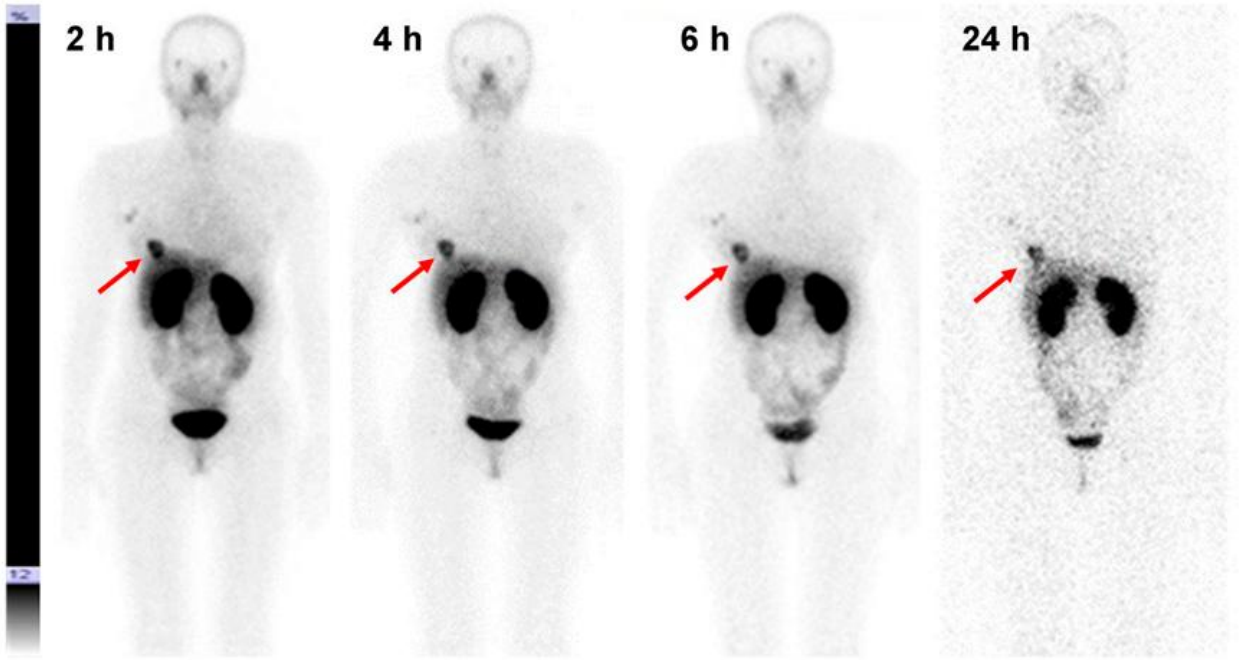


Рисунок 3 – Распределение радиотрейсера ^{99m}Tc-$(HE)_3$-G3 в органах и тканях у больной РМЖ с гиперэкспрессией HER2 через 2, 4, 6 и 24 часов после введения 3000 мкг: передняя проекция (стрелками показана опухоль правой молочной железы) [129]

Дополнительные данные о диагностических характеристиках DARPin $(HE)_3$-G3 были получены в прямом сравнительном клиническом исследовании с другим радиофармпрепаратом на основе каркасного белка – [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6. Было отобрано 11 ранее нелеченных пациенток с HER2-позитивным первичным и метастатическим раком молочной железы в возрасте от 26 до 65 лет. Каждой пациентке внутривенно вводили [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6, а через 3 – 4 дня – [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, с последующим проведением ОФЭКТ/КТ грудной клетки.

Оценку накопления препаратов выполняли путем измерения максимального стандартизованного уровня накопления (SUV_{max}).

Оба препарата продемонстрировали безопасность и эффективность в визуализации HER2-позитивных опухолей: все первичные опухоли и известные метастазы в лимфатические узлы были четко выявлены. При этом [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 показал статистически значимо более высокое накопление в первичных опухолях по сравнению с [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3: SUV_{max} составил 4,7 ± 2,1 против 3,5 ± 1,7 ($p < 0,005$). Во всех внеметастатических мягкотканных очагах накопление [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 также было значимо выше ($p < 0,0004$). Вместе с тем отношение опухоль/фон для препаратов статистически значимо не различалось ($p > 0,05$), что свидетельствует о сопоставимой контрастности визуализации. Отношение опухоль/фон для обоих препаратов статистически значимо не различалось ($p > 0,05$). У двух пациенток с метастазами в печень аккумуляция обоих препаратов в проекции метастазов значительно превышала таковую в первичной опухоли (у пациентки №1 – в 1,3 и 1,7 раза, у пациентки №5 – в 2,2 и 3,5 раза соответственно).

Таким образом, результаты клинических исследований свидетельствуют о диагностическом потенциале ^{99m}Tc-меченных DARPins для визуализации HER2-позитивных опухолей. DARPin $(HE)_3$-G3 продемонстрировал безопасность применения, возможность визуализации HER2-положительных опухолей и различения HER2-положительных и HER2-отрицательных опухолей, а также сопоставимую с [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 контрастность визуализации по отношению опухоль/фон. Особый интерес DARPin G3 представляет в связи со способностью связывать HER2 по эпитопу, отличному от эпитопа трастузумаба, что потенциально позволяет использовать данный радиотрейсер для оценки HER2-статуса в условиях проводимой анти-HER2-терапии. Таким образом, DARPin G3 является перспективной основой для разработки радиофармпрепаратов для неинвазивной оценки HER2-статуса и мониторинга пациентов, получающих таргетную терапию. [129].

Заключение по обзору литературы

Определение HER2-статуса является ключевым фактором выбора тактики лечения рака молочной железы. Стандартные методы – иммуногистохимическое исследование и флуоресцентная гибридизация *in situ* обладают известными ограничениями: зависимостью от преаналитических факторов, субъективностью интерпретации пограничных результатов и, главное, неспособностью оценить гетерогенность экспрессии HER2 во всем объеме опухолевой ткани. Эти ограничения обуславливают необходимость разработки неинвазивных методов визуализации, способных интегрально характеризовать рецепторный статус первичного очага и метастазов.

Методы радионуклидной диагностики ОФЭКТ и ПЭТ позволяют решить данную задачу при условии создания таргетного радиофармацевтического препарата, обладающего высоким сродством к HER2, благоприятной фармакокинетикой и приемлемой радиационной нагрузкой. Среди радионуклидов, применявшихся для визуализации HER2, ^{99m}Tc выделяется оптимальным сочетанием периода полураспада (6,02 ч), энергии гамма-излучения (140 кэВ) и доступности за счет генераторной системы ^{99}Mo/^{99m}Tc. Шестичасовой период полураспада хорошо согласуется с фармакокинетикой низкомолекулярных таргетных молекул, а развитая координационная химия позволяет реализовать несколько стратегий мечения – через оксо-ядро, HYNIC-опосредованное мечение или с использованием трикарбонильного предшественника $[^{99m}Tc]Tc(CO)_3^+$.

Применение полноразмерных антител, меченных долгоживущими радионуклидами, сопряжено с высокой радиационной нагрузкой, медленным достижением диагностически значимого соотношения «опухоль/фон» и ложноотрицательными результатами, обусловленными гетерогенностью экспрессии HER2. Ферментативные фрагменты антител, одноцепочечные вариабельные фрагменты и однодоменные антитела продемонстрировали

улучшенную фармакокинетику, однако их накопление в опухоли и общая диагностическая эффективность в ряде случаев оставались субоптимальными. Наибольший прогресс достигнут с появлением белковых каркасов (скаффолдов) – аффибоди, ADAPT и DARPins, которые сочетают высокое сродство к HER2 (K_D в пикомолярном и низком наномолярном диапазоне), медленную интернализацию и быстрый почечный клиренс, что позволяет получать изображения с высоким контрастом уже через 2 – 4 ч после инъекции.

Среди перечисленных каркасных белков особый интерес представляют DARPins. Искусственно сконструированные на основе анкириновых повторов, они обладают молекулярной массой 14 – 20 кДа, термостабильностью и способностью образовывать стабильные радиокомплексы с ^{99m}Tc. Клинические исследования [^{99m}Tc]Tc-DARPin9_29 и [^{99m}Tc]Tc-DARPin $(HE)_3$-G3, проведенные в НИИ онкологии Томского НИМЦ, подтвердили безопасность и хорошую переносимость данных радиофармпрепаратов, а также их способность дифференцировать HER2-положительные и HER2-отрицательные опухоли. Вместе с тем выявлен существенный недостаток – высокое фоновое накопление в печени, особенно выраженное для [^{99m}Tc]Tc-DARPin9_29, которое ограничивает чувствительность метода при визуализации метастазов данной локализации. Показано, что оптимизация вводимой белковой дозы способна частично снизить печеночный захват, однако проблема требует дальнейшего изучения.

Работка радиофармпрепаратов на основе DARPins, меченных ^{99m}Tc, является обоснованным направлением создания средств неинвазивной диагностики HER2-позитивного рака молочной железы. Дальнейшие исследования целесообразно сосредоточить на оптимизации молекулярного дизайна и оценке эффективности в рамках сравнительных исследований с клинически апробированным вариантом [^{99m}Tc]Tc-DARPin $(HE)_3$-G3.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика и синтез белков

Характеристика белка DARPin G3

Кодирующая последовательность DARPin G3 была наработана лабораторией молекулярной иммунологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством академика РАН, профессора Деева Сергея Михайловича.

В исследовании использовалась нуклеотидная последовательность гена DARPin G3, выведенная на основе аминокислотной последовательности, депонированной в базе данных PDB (идентификационный номер: 2JAB), с учетом частоты использования кодонов в высокоэкспрессируемых генах *Escherichia coli*. Оптимизация кодонов была выполнена при помощи свободно распространяемой программы DNABuilder (http://www.innovationsinmedicine.org/software/DNABuilder/ ; дата обращения: 15 января 2019 г). Ген DARPin G3 был собран методом ПЦР из химически синтезированных олигонуклеотидов длиной 50 пар оснований, обладающих частично комплементарными последовательностями, для последующей экспрессии в клетках *E. coli*.

Варианты DARPin G3 пептидными хелаторами на С-конце (G3-G_3C, G3-$(G_3S)_3C$ и G3-E_3C) и на N-конце (CE_3-G3, $C(G_3S)_3$-G3, $(HE)_3$-G3) были получены в *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen-EMD Millipore, Мэдисон, Висконсин, США) с убиквинтин-подобным модификатором SUMO [130], с использованием аналогичной ранее использованной методики [126].

Аминокислотная последовательность и основные числовые показатели таргетной молекулы **DARPin G3-G_3C**: DLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAKDEYGLPLYLATAHGHLEIVE

VLLNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAF
DISIGNGNEDLAEILQKLNGGGGC.

Число аминокислотных остатков: 127

Молекулярная масса: 13529,3 Да

Теоретическое значение изоэлектрической точки белка: 4,482

Молярный коэффициент поглощения: 2980

Весовой коэффициент поглощения ($см^{-1}мг^{-1}$/мл): 0,22

Аминокислотная последовательность и основные числовые показатели таргетной молекулы **DARPin G3-E_3C**:
DLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAKDEYGLPLYLATAHGHLEIVE
VLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKT
AFDISIGNGNEDLAEILQKLNGEEEC.

Число аминокислотных остатков: 130

Молекулярная масса: 13745,5 Да

Теоретическое значение изоэлектрической точки белка: 4,431

Молярный коэффициент поглощения: 2980

Весовой коэффициент поглощения ($см^{-1}мг^{-1}$/мл): 0,22

Аминокислотная последовательность и основные числовые показатели таргетной молекулы **DARPin G3-($G_3S)_3$C**:
DLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAKDEYGLPLYLATAHGHLEIVE
VLLNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAF
DISIGNGNEDLAEILQKLNGGGSGGGSGGGSC.

Число аминокислотных остатков: 134

Молекулярная масса: 14075,8 Да

Теоретическое значение изоэлектрической точки белка: 4,482

Молярный коэффициент поглощения: 2980

Весовой коэффициент поглощения ($см^{-1}мг^{-1}$/мл): 0,22

Аминокислотная последовательность и основные числовые показатели таргетной молекулы **DARPin G3-$(HE)_3$**:
MRGSHEHEHEGSDLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAKDEYGLTP

LYLATAHGHLEIVEVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKH GADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQKLN.

Число аминокислотных остатков: 134

Молекулярная масса: 14572,38 Да

Теоретическое значение изоэлектрической точки белка: 4,762

Молярный коэффициент поглощения: 2980

Весовой коэффициент поглощения ($см^{-1}мг^{-1}$/мл): 0,20

Аминокислотная последовательность и основные числовые показатели таргетной молекулы **DARPin CE_3-G3**: SCEEEGSDLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAKDEYGLTPLYLATA HGHLEIVEVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNA QDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQKLN.

Число аминокислотных остатков: 131

Молекулярная масса: 13919,6 Да

Теоретическое значение изоэлектрической точки белка: 4,431

Молярный коэффициент поглощения: 2980

Весовой коэффициент поглощения ($см^{-1}мг^{-1}$/мл): 0,21

Аминокислотная последовательность и основные числовые показатели таргетной молекулы **DARPin $C(G_3S)_3$-G3**: SCSGGGSGGGSGGGDLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAKDEYGL TPLYLATAHGHLEIVEVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLK HGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQKLN.

Число аминокислотных остатков: 138

Молекулярная масса: 14162,9Да

Теоретическое значение изоэлектрической точки белка: 4,584

Молярный коэффициент поглощения: 2980

Весовой коэффициент поглощения ($см^{-1}мг^{-1}$/мл): 0,21

Концентрации белков в очищенных растворах измеряли спектрофотометрически (Agilent Cary 4000, США) при 280 нм, используя теоретические молярные коэффициенты поглощения.

Для определения чистоты и идентификации структуры вариантов DARPin G3-G_3C, DARPin G3-E_3C, DARPin G3-$(G_3S)_3C$, DARPin G3-$(HE)_3$ применяли жидкостную хроматографию с электроспрей-ионизационной масс-спектрометрией (LC-ESI-MS) на масс-спектрометре 6520 Accurate Q-TOF LC/MS (Agilent, США). Для вариантов DARPin CE_3-G3, DARPin $C(G_3S)_3$-G3 и DARPin G3-$(G_3S)_3C$ проводили анализ первичной структуры методом ВЭЖХ/МС/МС с применением системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), с масс-спектрометром Orbitrap Tribrid Lumos (Thermo Fisher Scientific) с наноэлектроспрейным источником.

2.2 Клеточные линии и условия их культивирования

В качестве экспериментальных моделей для проведения исследований *in vitro* использовались HER2-позитивные клеточные линии аденокарциномы яичников SKOV-3, аденокарцинома молочной железы SK-BR-3 и клеточная линия с низкой экспрессий HER2 – аденокарцинома простаты PC-3. Все клеточные линии приобретены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, LGC Promochem, Борос, Швеция). Клеточные линии выращивали в стандартных условиях в среде RPMI-1640 (Thermo FS, США) и инкубировали при 37 °C в атмосфере CO_2 (5 %). Все используемые среды содержали 10 % фетальной бычьей сыворотки (ПанЭко, Россия) и раствор пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия). Клетки выращивали при 37 °C в атмосфере с 5 % CO_2.

2.3 Экспериментальные животные

Эксперименты по оценке биораспределения радиокомплексов проводились на здоровых мышах – самках стока CD-1 массой 20-30 г (n=24). Оценка биораспределения радиокомплексов и их таргетных свойств *in vivo* проводилась на иммунодефицитных мышах линии Nu/J массой 18-25 г (n=48). Мыши характеризуются отсутствием Т-клеток и проявляют недостаточность клеточно-опосредованного иммунитета, что позволяет использовать их в качестве биологической модели для выращивания карцином из раковых клеток человека. Исследование проводили на мышах с привитыми HER2-экспрессирующими ксенотрансплантантами клеточной линии аденокарциномы яичников SKOV-3, ксенотрансплантатами клеточной линии с низкой экспрессий HER2аденокарциномы простаты PC-3 или лимфомы Ramos (HER2-отрицательная).

Содержание, манипуляции и эксперименты с животными проведены в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных и были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол IACUC №1 от 27.09.2022).

2.4 Методики способов получения, контроля качества и оценки стабильности вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами, меченных технецием-99м

Методика восстановления вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами. К раствору, содержащему 4000 мкг белка, добавляли молярный избыток дитиотреитола (ДТТ) для достижения финальной концентрации 25 мМ. Смесь перемешивали и инкубировали при 40 °С в течение 1 часа. После

инкубации смесь очищали с использованием гель-фильтрации. Для этого в заранее откалиброванную в соответствии с инструкцией производителя колонку NAP-5 (Cytiva, Amersham, Великобритания) помещали реакционную смесь и элюировали 900 мкл 0,01 М фосфатно-буферным раствором (PBS). Собирали 3 фракции: № 1 – 200 мкл, № 2 – 500 мкл, № 3 – 200 мкл. Для дальнейшего проведения эксперимента использовали только фракцию № 2. Количество выделяемого белка определяли методом УФ-спектрофотомерии с использованием спектрофотометра NanoDrop One^{c} Microvolume UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали 0,01 М PBS.

Определение чистоты восстановленного белка. Чистоту белков определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле» в невосстанавливающих условиях. Приготовление концентрирующего и разделяющего геля проводили согласно методики, описанной для 15 % раствора акриламида. В лунки помещали 2 и 40 мкг белка и определяли интенсивность полосы димера и мономера. Интенсивность полосы димера на полосе 40 мкг не превышала интенсивности полосы мономера на полосе 2 мкг (не более 5%). Анализ геля проводили на белой подложке с помощью программы GelAnalyzer (версия 23.1.1 для Windows by Istvan Lazar Jr., PhD, and Istvan Lazar Sr., PhD, CsC.).

Методика получения ^{99m}Tc-радиокомплексов вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами. Для мечения использовали лиофилизат, содержащий 75 мкг хлорида олова (II) дигидрата (Fluka Chemika, Buchs, Швейцария), 5 мг глюконата натрия (Celsus Laboratories, Geel, Бельгия) и 100 мкг ЭДТА (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия), который растворяли в 100 мкл 0,01 М фосфатного буфера. Полученный раствор добавляли к раствору, содержащему 50-150 мкг целевого белка (варианты G3-G_3C, G3-E_3C или G3-$(G_3S)_3C$). Затем к реакционной смеси добавляли 100 мкл генераторного элюата, содержащего [^{99m}Tc]TcO_4^- с активностью 150-300 МБк. Радиоактивность измеряли с помощью радиометра (RIS 1A, Амплитуда, Россия), оснащенного ионизационной камерой,

[^{99m}Tc]TcO_4^-, получали из коммерческого генератора ^{99}Mo/^{99m}Tc GT-4K (ФГУП «Институт физической химии им. Карпова», Обнинск, Россия).

Полученную смесь инкубировали в течение 30 или 60 мин при температуре 60 °C. РХЧ и РХВ измеряли с использованием полосок iTLC с силикагелем (Aglient Technologies, Inc., Фолсом, США). Распределение радиоактивности вдоль полосок iTLC измеряли с помощью сканера iTLC miniGITA Single (Elysia Raytest, Германия) в 0,01 М фосфатном буфере. Меченые ^{99m}Tc варианты DARPin G3 и коллоид восстановленного гидролизованного ^{99m}Tc (ВГТ) оставались на линии старта, а свободный [^{99m}Tc]TcO_4^- мигрировал с фронтом растворителя. Для определения коллоида ВГТ использовали подвижную фазу пиридин : уксусная кислота : вода (10 : 3 : 1). В этой системе коллоид ВГТ оставался в точке нанесения, а [^{99m}Tc]TcO_4^- и меченые ^{99m}Tc варианты DARPin G3 мигрировали с фронтом растворителя.

Тест на стабильность проводили путем инкубации радиокомплексов с 5000-кратным молярным избытком *L*-цистеина в PBS до 6 часов при комнатной температуре; контрольные образцы инкубировали в PBS. РХЧ образцов анализировали с помощью радио-iTLC в PBS.

2.5 Методики способов получения, контроля качества и оценки стабильности вариантов DARPin G3 с HYNIC-хелатором, меченных технецием-99м

Методика конъюгации DARPin G3 с HYNIC-хелатором. Поскольку варианты DARPin CE_3-G3, DARPin $C(G_3S)_3$-G3, DARPin G3-G_3C, DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в своей структуре содержат цистеин на N и C-конце, перед конъюгацией с 5-малеимидо-2-гидразинийпиридина гидрохлоридом (HYNIC-малеимидом) проводили предварительное восстановление спонтанно образующихся межмолекулярных дисульфидных связей по методике описанной в пункте 2.4. (Методики способов получения и контроля качества вариантов DARPin G3 с

пептидными хелаторами, меченных технецием-99м). Свежевосстановленные варианты DARPin G3 конъюгировали с HYNIC-малеимидом, который растворяли в диметилформамиде в концентрации 1 мг/мл и добавляли к белкам в молярном соотношении 1:10 в PBS (pH 7,4), инкубируя при 40 °C в течение 1 часа. После инкубации реакционную смесь оставляли на 12 часов при температуре 4 °C. Концентрацию HYNIC-конъюгированных белков DARPin G3 после очистки на колонке NAP-5 измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop.

Методика получения ^{99m}Tc-радиокомплексов вариантов DARPin G3-HYNIC. К раствору вариантов DARPin G3-HYNIC (50-100 мкг) добавляли 100 мкл трицина (100 мг/мл в 0,01 М PBS), 100 мкл этилендиаминдиуксусной кислоты (ЭДДА) (50 мг/мл в 0,2 М NaOH), около 100-300 МБк раствора [^{99m}Tc]TcO_4^- элюата, 25 мкл хлорида олова (II) дигидрата (2 мг/мл в 0,01 М HCl). Тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали при 60 ˚C в течение 30 мин. После окончания инкубации смесь охлаждали 1 мин и определяли радиохимический выход. Очистку проводили с использованием колонок NAP-5, предварительно откалиброванных 0,01 М PBS в соответствии с инструкцией производителя.

РХВ и РХЧ измеряли с использованием радио-iTLC в PBS. Меченные ^{99m}Tc-DARPin G3-HYNIC и коллоид ВГТ оставались в точке нанесения, в то время как [^{99m}Tc]TcO_4^- и комплексы ^{99m}Tc с солигандами мигрировали с фронтом растворителя. Для определения присутствия коллоида восстановленного гидролизованного ^{99m}Tc полоски iTLC элюировали в системе 1М аммония ацетат-метанол (1:1). В этой системе коллоид оставался в месте нанесения, в то время как радиоактивно меченные ^{99m}Tc-DARPin G3-HYNIC, [^{99m}Tc]TcO_4^- и комплексы ^{99m}Tc с солигандами мигрировали с фронтом растворителя.

Тест на стабильность проводили путем инкубации очищенных радиоактивно меченых белков с 1000-кратным молярным избытком *L*-цистеина в PBS в течение до 6 часов при комнатной температуре; контрольные образцы

инкубировали в PBS. РХЧ образцов анализировали с помощью радио-iTLC в PBS.

2.6 Методика способа получения и контроля качества радиокомплекса [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3$-(HE)$_3$-DARPin G3

Элюат (500 мкл), содержащий 1-2 ГБк [^{99m}Tc]TcO_4^- добавляли в набор для получения трикарбонильного ^{99m}Tc ([^{99m}Tc]Tc$(CO)_3^+$) (CRS Isolink, PSI, Villigen, Швейцария), который затем инкубировали при 100 °C в течение 30 минут. После инкубации 50 мкл приготовленного раствора комплекса [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3^+$ добавляли к 40 мкг $(HE)_3$-G3 в 100 мкл PBS. Полученную смесь инкубировали в течение 60 мин при 60 °C. После инкубации к реакционной смеси добавляли 1000-молярный избыток *L*-гистидина (2,75 мкмоль, 425 мкг, 20 мг/мл в 0,01 М PBS и инкубировали в течение 15 мин при 60 °C. Полученный радиокомплекс[^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$-$(HE)_3$-DARPin G3 (или сокращенно [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3) очищали на колонках NAP-5, предварительно уравновешенных PBS в соответствии с инструкцией производителя. РХВ и РХЧ определяли методом радио-iTLC в системе PBS. Меченные [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 и коллоид ВГТ оставались в точке нанесения, а [^{99m}Tc]TcO_4^-, [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3^+$ и его комплекс с гистидином мигрировали с фронтом растворителя. Для определения присутствия ВГТ полоски iTLC элюировали в системе пиридин : уксусная кислота : вода (10 : 3 : 1). В этой системе коллоид остается в месте нанесения, а радиоактивно меченные [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, [^{99m}Tc]TcO_4^-, [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3^+$ мигрируют с фронтом растворителя.

Тест на стабильность проводили путем инкубации очищенных радиоактивно меченых белков с 5000-кратным молярным избытком *L*-гистидина в PBS в течение 6 часов при комнатной температуре; контрольные образцы инкубировали в PBS. Образцы были проанализированы с помощью радио-iTLC в PBS.

2.7 Методики изучения функциональной пригодности радиокомплексов *in vitro*

Методика определения специфичности радиокомплексов ^{99m}Tc-DARPin G3 в культуре клеток тканей злокачественных опухолей.

Использовались 2 клеточные линии: *исследуемая группа* – клеточная линия аденокарциномы яичников SKOV-3 и клеточная линия аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 с высоким уровнем экспрессии HER2 и *контрольная группа* – клеточная линия аденокарциномы простаты PC-3 с низким уровнем экспрессии HER2. Клеточные линии культивировали в среде DMEM («Панэко», Россия) с добавлением 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) и пенициллина-стрептомицина («Панэко») при 37 ºС и 5 % уровне CO_2. Клеточную суспензию пересевали в чашки Петри каждые 3-4 дня при достижении 70-80 % монослоя. Клетки снимали раствором трипсин-ЭДТА. Для изучения каждого радиокомплекса клетки высевали в 6-луночные планшеты по 600 000 клеток в лунку за день до эксперимента до образования монослоя. Для каждой клеточной линии использовали по два набора лунок. 100-кратный избыток немеченого белка DARPin G3 (500 мкл) добавляли к контрольной группе клеток (3 лунки) для насыщения HER2 рецепторов за 30 минут до добавления меченого белка. В остальные три добавляли равный объем полной среды. Затем в каждую лунку добавляли раствор DARPin G3, меченого ^{99m}Tc, до концентрации 1 нМ. Чашки инкубировали в течение 1 ч при 37 ºС. После инкубации среду собирали, клетки промывали PBS и объединяли эти растворы. Затем клетки снимали раствором трипсин-ЭДТА и собирали. Лунки промывали PBS, а растворы добавляли к клеточной суспензии. Активность во фракциях, содержащих среду или клетки, измеряли с помощью гамма-спектрометра с детектором NaI(TI) Wizard 2480 (Pelkin Elmer, США), рассчитывали процент клеточно-ассоциированной активности в пересчете на 1 млн клеток.

Методика изучения интернализации радиокомплексов ^{99m}Tc-DARPin G3 in vitro. Интернализацию всех вариантов меченного ^{99m}Tc DARPin G3 оценивали на клетках SKOV-3. Клетки (3 чашки в каждой временной точке, 10^6 клеток на чашку) непрерывно инкубировали с 1 нМ меченых ^{99m}Tc белков при 37 °C. Во время инкубации периодически определяли интернализованную фракцию методом кислотной промывки, ранее описанным для молекул аффибоди [92]. Мембранно-ассоциированные варианты DARPin G3 удаляли из клеток путем обработки 4 М раствором мочевины в 0,2 М глицинового буфера, pH 2,0, в течение 5 мин на льду. Раствор собирали и измеряли его активность с помощью гамма-спектрометра Wizard 2480. Клеточную фракцию, содержащую интернализованные конъюгаты, отделяли путем обработки 1 М NaOH в течение 30 мин при 37 °C. Радиоактивность во фракциях измеряли с помощью гамма-спектрометра, и рассчитывали процент общего количества клеточно-ассоциированной, мембранно-ассоциированной и интернализованной активности. Для проверки пригодности этого протокола для новых вариантов меченного ^{99m}Tc DARPin G3, клетки инкубировали на льду (когда интернализация не должна происходить) в течение 2 ч с мечеными молекулами DARPin G3, а затем проводили измерение интернализации как описано выше.

Методика определения равновесных констант диссоциации радиокомплексов ^{99m}Tc-DARPin G3 in vitro. Равновесные константы диссоциации (K_D) определяли с помощью метода насыщения. Набор из четырех чашек с клетками SKOV-3 был подготовлен для каждой концентрации исследуемого белка. Три опытные чашки использовали для определения специфического связывания и одну контрольную для определения неспецифического связывания путем блокирования рецепторов. Клетки высевали за день до эксперимента. Непосредственно перед измерениями среду удаляли, а клетки промывали PBS. Готовили восемь концентраций меченого белка (от 0,22 до 40 нМ). В контрольную чашку предварительно добавляли 500 мкл немеченого белка в концентрации 2000 нМ. В том же объеме добавляли среду в другие чашки и инкубировали (5% CO_2, 37 °C) в течение 30 мин. Необходимую концентрацию

меченого DARPin G3 добавляли в каждый набор клеток (4 °C, 500 мкл в чашку), клетки инкубировали при 4 °C в течение 4 ч. Среду удаляли, а клетки пятикратно промывали PBS перед добавлением раствора трипсина-ЭДТА (500 мкл в чашку), затем клетки дополнительно инкубировали в течение 10 мин. Отделенные клетки разбавляли 500 мкл полной среды, повторно суспендировали и переносили в пробирки с фракциями. Из каждой пробирки отбирали 50 мкл образца для подсчета клеток. Радиоактивность клеток и меченых белковых стандартов измеряли с помощью автоматического гамма-спектрометра Wizard 2480. Практически добавленные концентрации радиомеченых белков рассчитывали для каждой точки данных, используя наибольшую концентрацию, затем рассчитывали радиоактивность, связанную с клетками, в пмоль/10^5 клеток для каждого образца. B_{max} (максимальное количество сайтов связывания на клетку) и K_D рассчитывали с помощью программы Prism 9 для Windows (GraphPad Sofware, Сан-Диего, Калифорния, США).

2.8 Изучение биораспределения и таргетных свойств *in vivo*

Для изучения биораспределения вариантов DARPin G3 мыши стока CD-1 были рандомизированы в 12 групп по 4 мыши в каждой. После прохождения карантина каждой группе вводили один из меченных вариантов DARPin G3. Исследуемые белки сравнивали в следующей комбинации: (1) G3-G_3C, G3-E_3C, G3-$(G_3S)_3$C и $(HE)_3$-G3; (2) G3-G_3C-HYNIC, G3-E_3C-HYNIC, G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC, $(HE)_3$-G3; (3) HYNIC-CE_3-G3, HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 и G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и G3-E_3C-HYNIC), вводили внутривенно в дозе 10, 5 и 3 мкг белка на мышь, соответственно. Оценку биораспределения проводили через 4 ч после инъекции. Введенная активность исследуемых радиокомплексов составила 60 кБк. Через 4 ч после инъекции мышей анестезировали и эвтаназировали методом декапитации. Кровь, слюнные железы, легкие, печень, тонкий отдел кишечника, желудок, селезенку, почки, мышцы, кости собирали и взвешивали. Накопленную

активность измеряли с помощью автоматического гамма-спектрометра Wizard 2480 и рассчитывали, как процент введенной дозы на грамм образца (%ВД/г).

Для оценки таргетных свойств и биораспределения использовали иммунодефицитных мышей линии Nu/j с привитыми ксенотрансплантатами SKOV-3 с высокой экспрессией HER2. Полученные данные сравнивали с уровнем накопления активности в ксенотрансплантатах PC-3 с низкой экспрессией HER2 (для вариантов с пептидными хелаторами и вариантами с HYNIC на С-конце) и Ramos с отсутствием экспрессии (для вариантов с HYNIC на N-конце).

Имплантацию проводили подкожно в количестве 10^7 клеток в 100 мкл среды для всех клеточных линий. Эксперименты проводили через две недели после имплантации клеток SKOV-3, PC-3 или Ramos. Средний вес опухоли составлял 0,5 ± 0,1, 0,4 ± 0,2 и 0,05 ± 0,02 г для ксенотрансплантатов SKOV-3, PC-3 и Ramos, соответственно. Для каждого варианта использовали две группы из четырех мышей. Мышам вводили 3 мкг (в экспериментах сравнения с Ramos ксенотрансплантатами), 5 или 10 мкг (в экспериментах сравнения с PC-3 ксенотрансплантатами) меченных ^{99m}Tc вариантов DARPin G3 (60 кБк, 100 мкл в PBS с 1% BSA, содержащих 10 мкг/мл хлорида олова (II)) в хвостовую вену. Биораспределение меченных ^{99m}Tc вариантов DARPin G3 измеряли через 4 ч после введения.

Определение биораспределения у мышей с привитыми опухолями проводили так же, как и у мышей CD1. Визуализация мышей с ксенотрансплантатами SKOV-3, Ramos и PC-3, проводилась с помощью сканера Siemens E.Cam 180, оснащенного низкоэнергетическим коллиматором высокого разрешения (Siemens, Германия). Для визуализации экспрессии HER2 мышам вводили меченные ^{99m}Tc варианты DARPin G3 (5 мкг или 10 мкг, 8,2-8,6 МБк). Через 4 ч после инъекции мышей анестезировали и эвтаназировали методом декапитации, помещали на коллиматор гамма-сканера. Изображения получали в течение 30 минут и сохраняли в матрице 1024x256 пикселей. Контуры животных

были получены из цифровых фотографий и накладывались на изображение с гамма-камеры для упрощения интерпретации.

2.9 Методики способа получения и контроля качества набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc»

Методика получения набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc». Восстановление очищенного белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$ (серии наработаны ИБХ СО РАН) проводили сериями по 10 штук по 5 мг. К 5 мг белка добавляли раствор дитиотреитола (DTT; 1,6 мг в 40 мкл дегазированного 0,01 М PBS, pH 7,4; конечная концентрация DTT – 21 мМ). Реакционную смесь инкубировали при 40 °С в течение 60 мин для восстановления дисульфидных связей. Очистку восстановленного белка проводили гель-фильтрацией на предварительно уравновешенных колонках NAP-5 с элюированием 0,01 М PBS (pH 7,4) согласно инструкции производителя. Концентрацию очищенного белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Восстановленный белок фасовали по 3,3 мг и замораживали при –20°С.

Раствор вспомогательных веществ готовили в 0,01 М PBS (pH 7,4) из расчета на 1 мл: ЭДТА – 1 мг, дихлорид олова(II) – 0,75 мг, глюконат натрия – 50 мг, D-маннит – 6,6 мг, ПЭГ-4000 – 3,3 мг. Аликвоту полученного раствора (100 мкл) добавляли к белку, замораживали при –80°С в течение 4 ч и лиофилизировали при температуре –60 °С и давлении 0,05 торр в течение 12 ч.

Методика идентификации химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в наборе методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Приготовление испытуемого раствора. Лиофилизат, содержащий 3,3 мг белка G3-$(G_3S)_3C$ и вспомогательные вещества, растворили в 1 мл воды очищенной при комнатной температуре в течение 10 мин, периодически перемешивая на вортексе. Из полученного раствора взяли аликвоту 5 мкл, довели до 82 мкл водой очищенной.

Приготовление разделяющего геля. 5 мл раствора, содержащего 30 % N,N'-метилен-бисакриламида (АКА) смешивали с компонентами смеси в соответствии с пропорциями, указанными в таблице 1. Компоненты добавляли последовательно, как указано в таблице. После внесения персульфата аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (TEMED) смесь тщательно перемешивали и немедленно заливали в промежуток между двумя стеклянными пластинами ячейки, оставляли достаточное место для концентрирующего геля (длина зубцов гребенки плюс 1 см). Гель оставляли в вертикальном положении до полной полимеризации.

Таблица 1 – Приготовление разделяющего геля

Компоненты смеси	**Объем компонента**
30% АКА (Мединген, Россия)	2,5 мл
Вода очищенная	1,124 мл
1,5 М Трис-HCl (Helicon, Россия), pH 8,8	1,25 мл
10 % додецилсульфата натрия (SDS) (Мединген, Россия)	50 мкл
10 % персульфата аммония (Мединген, Россия)	50 мкл
TEMED (Helicon, Россия)	5 мкл

Приготовление концентрирующего геля. Для приготовления концентрирующего геля 2,5 мл раствора 30 % АКА смешивали с компонентами смеси, следуя последовательности, приведенной в таблице 2. После добавления персульфата аммония и TEMED смесь тщательно перемешивали и немедленно заливали в промежуток между двумя стеклянными пластинами ячейки непосредственно на поверхность полимеризованного разделяющего геля. В верхнюю часть геля помещали гребенку для формирования лунок. Гель оставляли в вертикальном положении до завершения полимеризации, после чего гребенку аккуратно извлекали.

Таблица 2 – Приготовление концентрирующего геля

Компоненты смеси	**Объем компонента, мл**
30% АКА	0,325
Вода очищенная	1,5
5,5 М Трис-HCl, pH 6,8	0,625
10 % SDS	0,025
10 % персульфата аммония	0,025
TEMED	0,0025

Методика проведения анализа. Камеры заполняли электродным буфером: Трис-HCl, глицин, SDS, вода деминерализованная. После чего в ячейку, сформированную гребенкой, помещали 7 мкл смеси белков маркеров молекулярной массы PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США), в соседние ячейки помещали испытуемый раствор, содержащий 2 и 20 мкг DARPin G3-$(G_3S)_3$C. Электрофорез проводили с помощью WIX-easyPRO2 Mini Easy (WIX Technology, Китай) при напряжении 110 В в течение 2 ч. После завершения электрофореза положение полосы бромфенолового синего, соответствующей электрофоретическому фронту, отмечали с помощью надрезов-меток. Гель фиксировали в 10% трихлоруксусной кислоте (ТХУ) в течение часа, окрашивали в красящем растворе Кумасси В-250 в течение 45 мин. Излишки красителя смывали раствором, содержащим 7 % ледяной уксусной кислоты, 10 % изопропанола в воде в течение 12 ч.

Анализ геля проводили на белой подложке с помощью программы GelAnalyzer (версия 23.1.1 для Windows by Istvan Lazar Jr., PhD, and Istvan Lazar Sr., PhD, CsC.). Молекулярную массу белка G3-$(G_3S)_3$C определяли сравнением его подвижности с подвижностью белков маркеров. Для этого измеряли расстояния пробега для каждой полосы белков (маркеров и испытуемого образца) от вершины разделяющего геля до середины полосы. Определяли отношение расстояния пробега каждого белка к расстоянию пробега фронта

красителя (R_f). Строили график зависимости логарифма относительных молекулярных масс стандартов белков маркеров от значения R_f.

Методика идентификации химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3$C в наборе методом ВЭЖХ-МС/МС. Анализ первичной структуры DARPin G3-$(G_3S)_3$C методом ВЭЖХ-МС/МС проводили с помощью системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), с масс-спектрометром Orbitrap Tribrid Lumos (Thermo Fisher Scientific) с наноэлектроспрейным источником.

Аликвоту испытуемого раствора, содержащего 10 мкг DARPin G3-$(G_3S)_3$C сублимировали (SpeedVac, Savant, Франция), восстанавливали и алкилировали в 10 мкл буфера, содержащего 100 мМ Трис-HCl pH 8,5, 1% дезоксихолата натрия, 10 мМ TCEP (трис(2-карбоксиэтил)фосфин) и 20 мМ 2-хлорацетамида. Инкубацию проводили при 85 °C в течение 10 мин с последующим охлаждением до комнатной температуры. Для ферментативного расщепления добавляли 0,2 мкг трипсина в 5 мкл 100 мМ Трис-HCl (pH 8,5) и инкубировали 16 ч при 37 °C. Реакцию останавливали равным объемом 2% трифторуксусной кислоты (ТФУ).

Очистку пептидов выполняли на микроколонках SDB-RPS StageTip (3 слоя мембраны 3M, США, установленные в наконечник 200 мкл). Пробу наносили центрифугированием при 300 g, промывали дважды 50 мкл смеси 1% ТФУ/этилацетат (1:1) и 50 мкл 0,2% ТФУ, затем элюировали 60 мкл раствора 5% гидроксида аммония в 60% ацетонитриле. Элюат высушивали вакуумным центрифугированием, хранили при -80 °C. Перед анализом пептиды ресуспендировали в 40 мкл 0,1% ТФУ с 2% ацетонитрилом.

Образцы загружали на предколонку 50 × 0,1 мм, заполненную сорбентом Reprosil-Pur 200 C18-AQ 5 мкм (Dr. Maisch, Германия) с размером пор 120 Å. Пептиды растворяли в смеси, содержащей 2% ацетонитрила, 98% воды и 0,1% ТФА. Разделение проводили на кварцевой колонке 300 × 0,1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, США) и заполненной сорбентом Reprosil PUR C18AQ 1,9 мкм, 120 Å (Dr. Maisch) при скорости потока 4,2 мкл/мин.

Для элюирования использовали подвижные фазы: А (99,9% воды и 0,1% муравьиной кислоты); Б (19,9% воды, 0,1% муравьиной кислоты и 80% ацетонитрила).

Пептиды разделяли линейным градиентом при скорости потока 500 нл/мин. Анализ и статистическую обработку полученных масс-спектров проводили с помощью программы Peaks Studio 11 (Bioinformatics Solutions Inc.) [131]. При сопоставлении аминокислотных последовательностей с базой данных учитывали следующие пост-трансляционные модификации: карбамидометилирование цистеина (Cys); деамидирование аспарагиновой и глутаминовой кислот (Asn/Gln); окисление метионина (Met).

Дополнительно учитывали целевую модификацию Cys с брутто-формулой C(9)H(8)N(2)O(2) и моноизотопной массой 204,0641. Уровень ложноположительных идентификаций установили на уровне 0,01, проверяя результаты по реверсной базе данных. В настройках поиска специфичность протеазы была установлена на трипсин (полуспецифичность) с допущением до 3 пропущенных сайтов протеолиза. Допустимое отклонение массы иона-предшественника составляло до 10 м.д., а массы фрагментов – до 0,2 Да.

Методика количественного определения химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в наборе. Для приготовления испытуемого раствора с концентрацией 1,65 мг/мл лиофилизат, содержащий 3,3 мг белка G3-$(G_3S)_3C$ со вспомогательными веществами (один набор для приготовления РФЛП), растворяли в 2 мл фосфатного буфера (0,01 М) при комнатной температуре в течение 10 минут, периодически перемешивая на вортексе.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см при длине волны 280 нм, используя раствор сравнения. Анализ проводили в трех повторениях для обеспечения точности результатов. Расчет концентрации производили с использованием молярного коэффициента поглощения по формуле 1.

$$x = \frac{A}{2908 * 1} * 14075 * 2$$

где x – содержание DARPin G3-$(G_3S)_3C$ во флаконе, мг; A – измеряемая оптическая плотность; 2980 – молярный показатель поглощения, $M^{-1}*см^{-1}$; 1 – длина оптического пути или толщина слоя, см; 14075 – молярная масса DARPin G3-$(G_3S)_3C$, Да; 2 – объем испытуемого раствора, мл.

2.10 Методики получения и контроля качества готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc»

Методика получения готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc». В набор для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» добавляли раствор натрия пертехнетата с активностью не менее 500-700 МБк, после чего инкубировали смесь при 60 °С в течение 30 мин. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры (2 – 5 мин), отбирали стерильным шприцем объемом 10 мл и доводили объем до 10 мл стерильным 0,9% раствором хлорида натрия. Стерилизующую фильтрацию проводили через фильтр Sterifix Braun 0,22 мкм (B. Braun Medical, Германия) в стерильный апирогенный флакон.

Для контроля качества отбирали аликвоту 30,0 мкл стерильным шприцем, после чего проводили контроль качества.

Методика определения контроля качества готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc».

Радиохимическую чистоту определяли методом ТСХ в соответствии с ОФС «Тонкослойная хроматография».

Примесь А: $[^{99m}Tc]TcO_4^-$ пертехнетат-ион.

Испытуемый раствор: Лекарственный препарат.

Условия хроматографирования:

– ТСХ пластинка со стекловолокном и слоем силикагеля (iTLC);

– *подвижная фаза:* PBS 0,01 М;

– *наносимый объем пробы:* 2-5 мкл;

– *пробег фронта подвижной фазы:* 8-10 см, примерно 10 минут;

– *обработка зон абсорбции:* немедленное извлечение пластинки из камеры после завершения хроматографирования;

– детектирование: детектор miniGITA OFA probe (BGO)

На полученной радиохроматограмме факторы удерживания (R_f) составляют: [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ и коллоид восстановленного гидролизованного технеция [^{99m}Tc]TcO_2 – от 0,0 до 0,1; [^{99m}Tc]TcO_4^- пертехнетат-ион – от 0,9 до 1,0.

Примесь В: коллоид восстановленного гидролизованного технеция [^{99m}Tc] TcO_2.

Испытуемый раствор: Лекарственный препарат.

Условия хроматографирования:

– ТСХ пластинка со стекловолокном и слоем силикагеля (iTLC);

– *подвижная фаза:* ацетонитрил : вода (2:3);

– *наносимый объем пробы:* 2-5 мкл;

– *пробег фронта подвижной фазы:* 8-10 см;

– *обработка зон абсорбции:* немедленное извлечение пластинки из камеры после завершения хроматографирования;

– детектирование: детектор miniGITA OFA probe (BGO)

На полученной радиохроматограмме факторы удерживания (R_f) составляют: коллоид восстановленного гидролизованного [^{99m}Tc] – от 0,0 до 0,1; [^{99m}Tc]TcO_4^- пертехнетат-ион и [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ – от 0,9 до 1,0.

2.11 Анализ и статистическая обработка данных

Достоверность межгрупповых различий оценивали с помощью двух значений – использовался непарный двусторонний t-критерий Стьюдента (t-тест) для параметрических данных и U-критерий Манна-Уитни для непараметрических данных. При сравнении нескольких межгрупповых значений

использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим критерием Тьюки. Статистически значимыми считали различия при уровне доверительной вероятности $p \leq 0,05$. Знаки: * соответствует $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США) для статистических расчетов, GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США) для визуализации данных и MS Excel 2019 (Microsoft, США) для первичной обработки. Для экспериментальных выборок вычисляли среднее арифметическое значение ($\bar{x}$), стандартное отклонение (S), стандартное отклонение среднего результата ($S_{\bar{x}}$), относительное стандартное отклонение (RSD, %), относительную ошибку среднего результата ($\bar{\varepsilon}$,%); доверительный интервал среднего значения ($\Delta\bar{x}$, p=0,95).

Валидация методик проводилась согласно ОФС «Валидация аналитических методик».

Результаты определения РХВ и РХЧ в подборе оптимальных параметров синтеза радиокомплексов, специфической активности и прочее представлены как среднее ± стандартное отклонение с указанием числа независимых экспериментов (n=3-5).

ГЛАВА 3 ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПРИГОДНОСТИ РАДИОКОМПЛЕКСОВ ВАРИАНТОВ DARPIN G3

3.1 Получение и восстановление вариантов DARPin G3, конъюгация с HYNIC хелатором

Получение вариантов DARPin G3

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 были получены в лаборатории ИБХ СО РАН с использованием E. coli и затем очищены.

Подлинность и чистоту белков непосредственно после получения исследовали методом электрофореза в ПААГ. Анализ подтвердил подлинность получаемых белков, чистота составила более 95 %. Для подлинности для вариантов DARPin G3-G_3C, DARPin G3-E_3C, DARPin G3-$(G_3S)_3C$ также использовали ВЭЖХ-МС. Чистота белков составляла почти 100%. Результаты масс-спектрометрического анализа представлены на рисунке 4 и в таблице 3. Деконволюция данных масс-спектрометрии показала, что белки присутствуют в основном в димерной форме (рисунок 4). Молекулярные массы соответствующих мономеров соответствуют расчетным значениям с точностью до 0,5 Да (таблица 3).

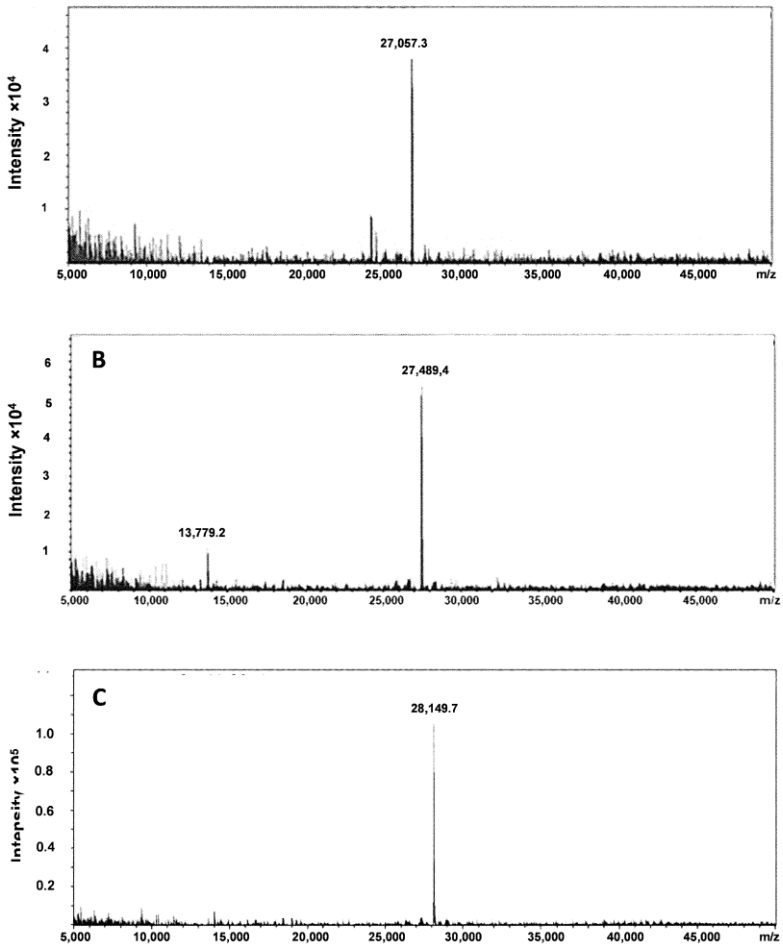


Рисунок 4 – Деконволюция масс-спектров (A) G3-G_3C, (B) G3-E_3C и (C) G3-$(G_3S)_3C$

Таблица 3 – Результаты ВЭЖХ-МС анализа немеченых вариантов DARPin G3, содержащих на С-конце хелатирующие последовательности из аминокислот G_3C, E_3C и $(G_3S)_3C$.

Вариант	**$M_{w\ теор.}$ (Да)**	**$M_{w\ практ.}$ (Да)**
G_3C	13529,3	27057,3 (димер)
		13529,7 (мономер)
$(G_3S)_3C$	14075,6	28149,8 (димер)
		14075,9 (мономер)
E_3C	13745,5	27489,4 (димер)
		13745,7 (мономер)

Подлинность и чистоту вариантов DARPin CE_3-G3, DARPin $C(G_3S)_3$-G3 и DARPin G3-$(G_3S)_3C$ определяли методом ВЭЖХ-МС/МС в ЦКП в ИБХ СО РАН. Метод позволяет с приемлемой точностью идентифицировать аминокислотную последовательность белка путем расщепления его до пептидных фрагментов с последующим разделением и идентификацией этих фрагментов в воспроизводимых условиях.

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 (Приложение Д. рисунок Д1-Д3). Значение 10LogP составило более 20 (вероятность случайного совпадения идентифицированного пептида с базой данных составило менее 1%). Это позволяет идентифицировать индивидуальные пептиды с высокой степенью достоверности.

Содержание предполагаемых примесей других белков составило не более 2%. Соответственно чистота белков, установленная этим методом, составляет 98%.

Восстановление цистеинсодержащих вариантов DARPin G3

Поскольку цистеинсодержащие варианты DARPin G3 способны образовывать спонтанные межмолекулярные дисульфидные связи, перед дальнейшей работой с этими вариантами проводили восстановление с применением раствора DTT (рисунок 5).

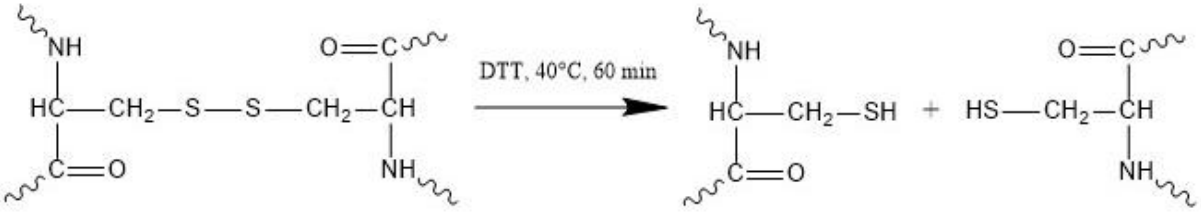


Рисунок 5 – Разрыв дисульфидных связей в белках DARPin G3 с использованием восстановителя

Чистоту получившегося мономера у вариантов DARPin G3 определяли в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле». Приготовление

концентрирующего и разделяющего геля проводили согласно методике, описанной для 15 % раствора акриламида. Результаты электрофореза в полиакриламидном геле показали – содержание примеси гомодимера у всех восстановленных вариантов DARPin G3 не превышало 5% (рисунок 6).

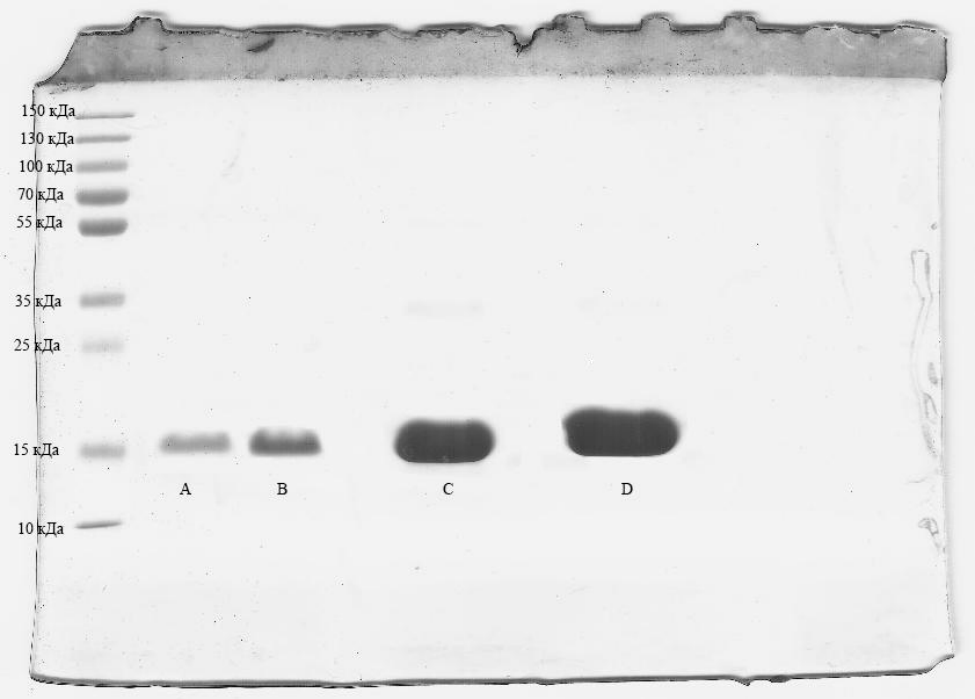


Рисунок 6 – Электрофорез в полиакриламидном геле на примере очищенных DARPin G3-HYNIC вариантов: (A) HYNIC-CE_3-G3, (B) HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3, (C) G3-E_3C-HYNIC, и (D) G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC

Конъюгация вариантов DARPin G3 с HYNIC-хелатором

Все варианты DARPin G3 с аминокислотными последовательностями CE_3, $C(G_3S)_3$ и G_3C, E_3C, $(G_3S)_3C$ на N- и C-концах соответственно были конъюгированы с HYNIC-малеимидом с высоким выходом. Конъюгацию с HYNIC-малеимидным хелатором проводили после предварительного восстановления дисульфидных связей, полученные варианты были обозначены как HYNIC-CE_3-G3, HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3, G3-E_3C-HYNIC и G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC, G3-G_3C-HYNIC.

Соотношение HYNIC и DARPin G3 для конъюгации предложено использовать 10:1. Результаты анализа чистоты HYNIC-конъюгированных белков методом электрофореза в ПААГ в невосстанавливающих условиях

(рисунок В1) показали, что уровень гомодимеров составлял не более 2 % для каждого варианта.

Для окисления любых возможных непрореагировавших цистеинов в HYNIC-конъюгированных белках был добавлен окислитель (йод), который окислил цистеины в дисульфиды, образующие гомодимеры. Анализ белков после добавления окислителя методом электрофореза в ПААГ не показал увеличения процента гомодимеров. Следовательно, все свободные цистеины в белках были связаны с HYNIC.

3.2 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 влияния пептидной хелатирующей группы, содержащей цистеин на С-конце, на способность белка образовывать комплекс с таргетной молекулой DARPin G3 [132 – 134]. В качестве пептидных цистеинсодержащих хелаторов использовали 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).

Предложенные хелатные группы представляют собой N_3S триамидтиольные хелаторы, для которых характерно образование стабильных комплексов с оксотехнецием ([^{99m}Tc]TcO^{3+}) [135]. В качестве восстановителя в реакционной смеси предложено использовать дигидрат хлорида олова (II), под действием которого пертехнетат-ион ([^{99m}Tc]TcO_4^-) восстанавливается до [^{99m}Tc]TcO^{3+}.

$$2\ [^{99m}Tc]TcO_4^- + 3\ Sn^{2+}\ 16\ H^+ \longrightarrow 2\ [^{99m}Tc]TcO^{3+} + 3\ Sn^{4+} + 8\ H_2O$$

Рисунок 7 – Схема восстановления пертехнетат-иона

В ходе реакции пертехнетат-ион способен образовывать промежуточные соединения ^{99m}Tc (VI), которые диспропорционируют с образованием исходного пертехнетат-иона и в Tc (IV). Последний, в свою очередь, гидролизуется до нерастворимого коллоидного гидролизованного технеция (TcO_2). Кроме того, Sn^{4+} так же может образовывать коллоид в водном растворе – SnO_2. Для стабилизации процесса в состав метящей смеси введен ЭДТА, которая устраняет каталитическое влияние Cu^{2+} и Fe^{3+} на окисление ^{99m}Tc (V) до Tc (VI), связывает Sn^{4+} и Tc^{4+}, предотвращая тем самым гидролиз и образование нерастворимого коллоида, который мешает комплексообразованию оксотехнециевого ядра $[^{99m}Tc]TcO^{3+}$ с целевой молекулой белка. (рисунок 8)

Также в составе метящей смеси предлагается добавить глюконат натрия в качестве транс-хелатирующего лиганда, который позволяет реализовать контролируемое замещение лабильного комплекса $[^{99m}Tc]Tc$-глюконат на цистеинсодержащий хелатор [136].

1. $[^{99m}Tc]TcO_4^- + C_6H_{11}O_7^- + Sn^{2+} + 2H^+ \rightarrow [^{99m}Tc]TcO(C_6H_{11}O_7)_2^- + Sn^{4+} + H_2O$
2. $[^{99m}Tc]TcO(C_6H_{11}O_7)_2^- + HS\text{-}Cys\text{-}G3 \rightarrow [^{99m}Tc]TcO(S\text{-}Cys\text{-}G3)^+ + 2C_6H_{11}O_7^- + H^+$

Рисунок 8 – схема трансхелатирования глюконата натрия. 1 – образование комплекса глюконата с ^{99m}Tc (V). 2 – замещение глюконата цистеинсодержащим комплексоном и стабилизация структуры радиокомплекса

В результате технеций-99м образует комплекс с тиоловой группой цистеина и амидными азотами аминокислот, расположенными на С-конце DARPin G3 (рисунок 9).

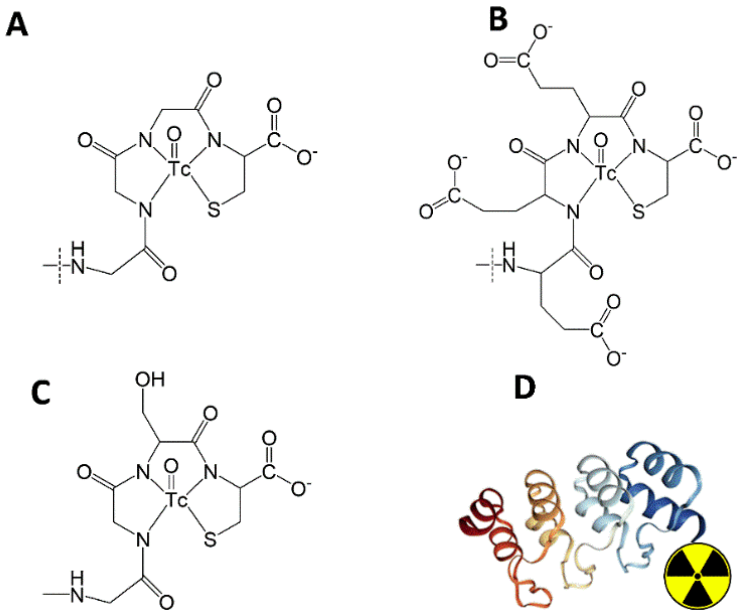


Рисунок 9 – Предполагаемая структура радиокомплексов (A) G3-G_3C,(B) G3-E_3C, (C) G3-$(G_3S)_3C$ и (D) их расположение на C-конце G3-цепи DARPin G3

Первоначально мечение ^{99m}Tc новых вариантов (G3-G_3C, G3-E_3C и G3-$(G_3S)_3C$) проводилось без предварительного восстановления спонтанно образующихся межмолекулярных дисульфидных связей между цистеинами. Радиохимический выход составлял 30 – 80%, а после очистки с использованием колонки NAP-5 радиохимическая чистота достигала 80 – 90%. При восстановлении DARPins перед мечением дитиотреитолом (DTT) радиохимический выход составлял 97 – 99%. Радиохимическая чистота после очистки была близка к 100% (Таблица 4). Оптимизация методик мечения заключалась в подборе оптимальных значений времени и температуры инкубации. Смесь инкубировали при температуре 50, 60 и 80 °C в течение 15, 30, 60 или 90 мин.

Для вариантов G3-G_3C и G3-$(G_3S)_3C$ для получения максимального выхода требовалось время инкубации не более 30 мин. Для достижения максимального включения радионуклида в G3-E_3C потребовалось несколько больше времени, 60 минут. Радиохимический выход через 30 минут составил около 80%. Оптимальной температурой для всех вариантов установлено значение 60 °C.

Таблица 4 – Оптимизация методики мечения DARPin G3 с ^{99m}Tc в зависимости от времени инкубации. Результаты представлены как $\bar{x} \pm S$ (n=2)

Радиокомплекс	**Время инкубации**	**РХВ, %**		
		50 °C	60 °C	80 °C
[^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-E_3C	15 мин	51 ± 0	62 ± 2	63 ± 1
	30 мин	58 ± 2	81 ± 1	85 ± 1
	60 мин	73 ± 1	98 ± 1	92 ± 1
	90 мин	80 ± 1	91 ± 1	95 ± 1
[^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-G_3C	15 мин	64 ± 1	83 ± 2	73 ± 1
	30 мин	65 ± 1	98 ± 1	98 ± 1
	60 мин	75 ± 2	98 ± 1	95 ± 2
	90 мин	82 ± 2	95 ± 1	89 ± 1
[^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3$C	15 мин	57 ± 1	78 ± 1	80 ± 1
	30 мин	60 ± 1	98 ± 1	96 ± 1
	60 мин	82 ± 0	98 ± 1	96 ± 2
	90 мин	89 ± 0	92 ± 2	93 ± 1

Так как РХВ составил 98 % дополнительную очистку не проводили.

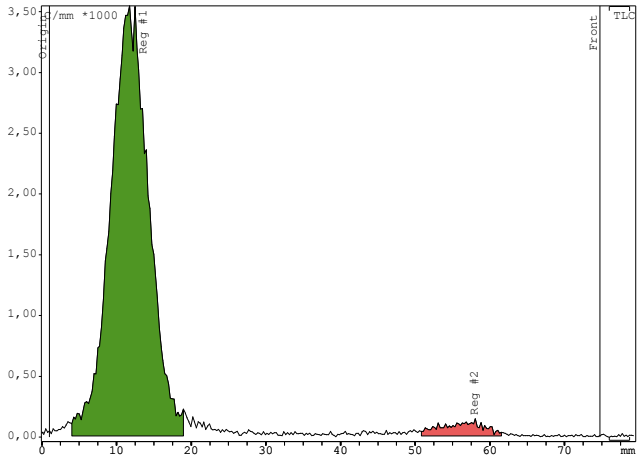


Рисунок 10 – Репрезентативная радиохроматограмма [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-E_3C (iTLC, подвижная фаза – PBS)

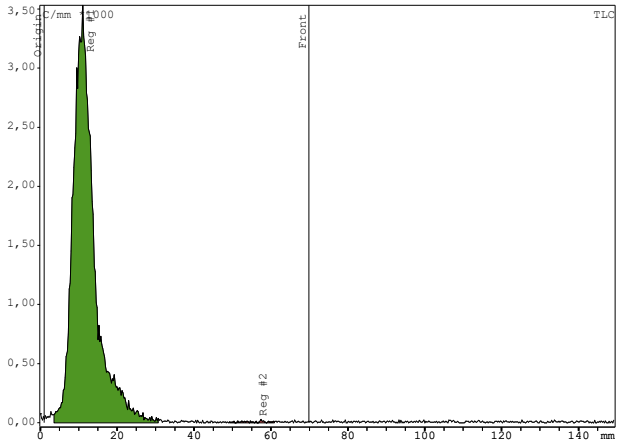


Рисунок 11 – Репрезентативная радиохроматограмма [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-G_3C (iTLC, подвижная фаза – PBS)

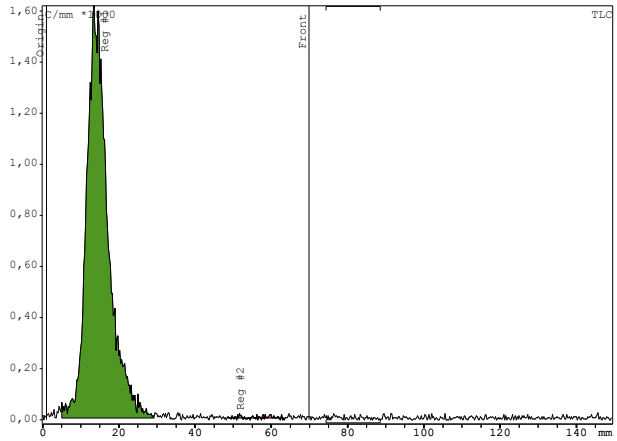


Рисунок 12 – Репрезентативная радиохроматограмма [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3$C (iTLC, подвижная фаза – PBS)

Для оценки возможности повторного окисления ^{99m}Tc, а также стабильности комплекса [^{99m}Tc]Tc-DARPin-G3 проводили оценку стабильности *in vitro* всех вариантов при хранении в PBS. По результатам радиохимическая чистота составляла ≥97% после 4 ч инкубации (Таблица 5). В данном исследовании мы намеренно ограничили тест на стабильность в PBS 4 ч, так как биораспределение и визуализация *in vivo* в нашей работе проводились через 4 ч после инъекции. Практическое окно для диагностической процедуры ограничено первыми несколькими часами после введения. Поэтому даже 6-часовой тест на стабильность *in vitro* выходит за рамки соответствующего периода использования и не является информативным для оценки характеристик агента в контексте его предполагаемого применения.

Выбор PBS в качестве среды для первичного тестирования обусловлен тем, что данный буфер позволяет оценить принципиальную устойчивость метки к гидролизу и окислению в отсутствие трансхелатирующих агентов, присутствующих в плазме крови. Более сложные испытания в сыворотке крови, имитирующие конкурентное связывание с белками, будут проведены позже в рамках исследования стабильности *in vivo*. Также необходимо подчеркнуть, что наиболее важной характеристикой является оценка стабильности комплекса непосредственно *in vivo*, чему будут посвящены следующие разделы данной работы.

Таблица 5 – Результаты определения стабильности [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-E_3C, [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3$C *in vitro* (n=2)

	РХЧ, %		
	1 ч	2 ч	4 ч
[^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-E_3C	98 ± 0	98 ± 1	97 ± 1
[^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-G_3C	99 ± 0	99 ± 0	98 ± 0
[^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3$C	99 ± 0	99 ± 0	98 ± 1

Таким образом, были предложены способы получения комплексов DARPin G3-E_3C, DARPin G3-G_3C и DARPin G3-$(G_3S)_3$C с ^{99m}Tc, оптимизированы параметры мечения, предложена методика мечения DARPin G3 с цистеинсодержащим пептидным хелатором. При оптимизации 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 инкубации 60 °C. РХВ всех вариантов составил более 98 %. Доказана высокая стабильность при хранении в 0,01 М фосфатном буфере в течение 4 ч.

3.3 Получение ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором и определение их стабильности

Альтернативой ядру оксотехнеция является способ получения комплексов посредством образования HYNIC-ядра. В отличие от классических триамидтиольных хелаторов, HYNIC не способен самостоятельно насытить координационную сферу технеция, что требует применения дополнительных со-лигандов для завершения координационной сферы. В качестве восстановителя в реакционной смеси предлагается использовать дигидрат хлорида олова (II), под действием которого пертехнетат-ион ([^{99m}Tc]TcO_4^-) восстанавливается до [^{99m}Tc]Tc(V) в связи с гидразино-группой в HYNIC ядре.

В ходе реакции пертехнетат-ион способен образовывать промежуточные соединения ^{99m}Tc(VI), которые диспропорционируют с образованием исходного пертехнетат-иона и Tc (IV). Для стабилизации процесса и предотвращения образования коллоидов в состав метящей смеси вводят солиганды – трицин и ЭДДА (этилендиамин-N,N'-диуксусная кислота). Солиганды выполняют роль транс-хелатирующих агентов, обеспечивая насыщение координационной сферы ^{99m}Tc и стабилизацию комплекса. Трицин выступает в качестве первичного солиганда, который позволяет реализовать контролируемое замещение с образованием лабильного промежуточного комплекса.

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-$(G_3S)_3C$), так как они являются наиболее подходящими для реализации данного подхода в связи с возможностью конъюгировать HYNIC-малеимид с тиольной группой цистеина. Далее для расширения дизайна использовали для мечения два белка DARPin G3 с аминокислотными линкерами на N-конце (CE_3-G3 и $C(G_3S)_3$-G3).

Такой дизайн для оценки влияния положения хелатора нередко используется и предоставляет ценную информацию о связи структура – свойства и позволяет выбрать наиболее оптимальный вариант. Примерами таких дизайнов является хелатор DOTA для связывания трехвалентных металлов – ^{177}Lu и ^{68}Ga, а также исследование комплексов Affibody и ^{99m}Tc [137 – 139].

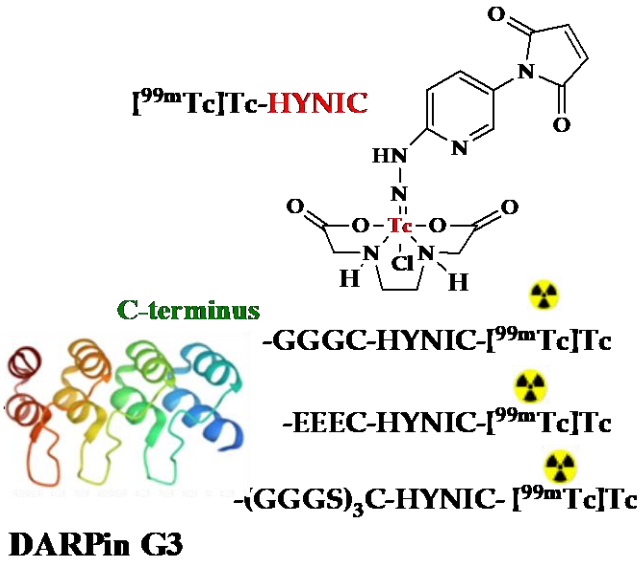


Рисунок 13 – Предполагаемая структура радиокомплексов (A) G3-G_3C-HYNIC, (B) G3-E_3C-HYNIC, (C) G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и их расположение на C-конце G3-цепи DARPin G3

Мечение трех вариантов G3-G_3C-HYNIC, G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и G3-E_3C-HYNIC было выполнено с солигандами трицином и ЭДДА для формирования комплекса [^{99m}Tc]Tc-HYNIC. G3-G_3C-HYNIC и G3-E_3C-HYNIC продемонстрировали заметно более низкие радиохимические выходы (около 50%), чем G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC (РХВ в диапазоне 80-87%). При смещении pH в более кислую сторону (pH ≤4) происходит протонирование гидразинового атома азота в структуре HYNIC-малеимид, что усложняет координационное и электрохимическое взаимодействие с восстановленным Tc^{5+}, а также вызывает затруднение в координационном взаимодействии с солигандами трицин и ЭДДА. Увеличение pH ≥9 приводит к гидролизу олово (II) хлорида с образованием нерастворимого коллоидного олова SnO_2. Положительного

влияния изменения pH на увеличение радиохимического выхода не наблюдалось.

Все варианты были очищены с использованием колонок NAP-5, обеспечивающих РХЧ более 96% (Таблица 6).

Таблица 6 – Радиохимический выход, изолированный выход, радиохимическая чистота и максимальная специфическая активность для [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC вариантов

	РХВ, %	Изолированный выход, %	РХЧ, %	Максимальная специфическая активность, МБк/мкг
[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC	51 ± 1	44 ± 2	97 ±1	4,1
[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC	85 ± 2	67 ± 2	98 ± 1	4,4
[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC	54 ± 2	45 ± 3	97 ± 1	3,7

Содержание радиоколлоида находилось в диапазоне 0,2−1,0%. G3-G_3C-HYNIC и G3-E_3C-HYNIC продемонстрировали меньшую стабильность при инкубации в PBS в течение 4 часов, чем вариант, содержащий $(G_3S)_3$C-линкер (Таблица 7). Эти варианты продемонстрировали высвобождение активности на 6-7% через 2 ч и на 8-11% через 4 часа инкубации в PBS. Однако после добавления 20 мкг/мл олова (II) хлорида в качестве антиоксиданта [140] в буфер для хроматографической очистки, высвобождения ^{99m}Tc не наблюдалось (РХЧ ≥ 96%, 4 часа).

Таблица 7 – Стабильность *in vitro* вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC

	Протеин-ассоциированная активность, %					
	1 ч		2 ч		4 ч	
	PBS	Sn^{2+}	PBS	Sn^{2+}	PBS	Sn^{2+}
[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC	96 ± 0	99 ± 0	94 ± 0	98 ± 0	92 ± 1	96 ± 0
[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC	98 ± 0	100 ± 0	96 ± 0	99 ± 0	95 ± 1	97 ± 0
[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC	96 ± 0	99 ± 0	93 ± 0	98 ± 0	89 ± 1	96 ± 0

Далее получали новые радиокомплексы белков с HYNIC-хелатором на N-конце ([^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3, [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3). Исследование проводили при прямом сравнении с вариантами DARPin G3-HYNIC на C-конце при повторном мечении в тот же день, что и варианты DARPin G3-HYNIC на N-конце. Обобщенные в сравнении схематичные структуры G3-E_3C-HYNIC, G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC, HYNIC-CE_3-G3 и HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 представлены на рисунке 14.

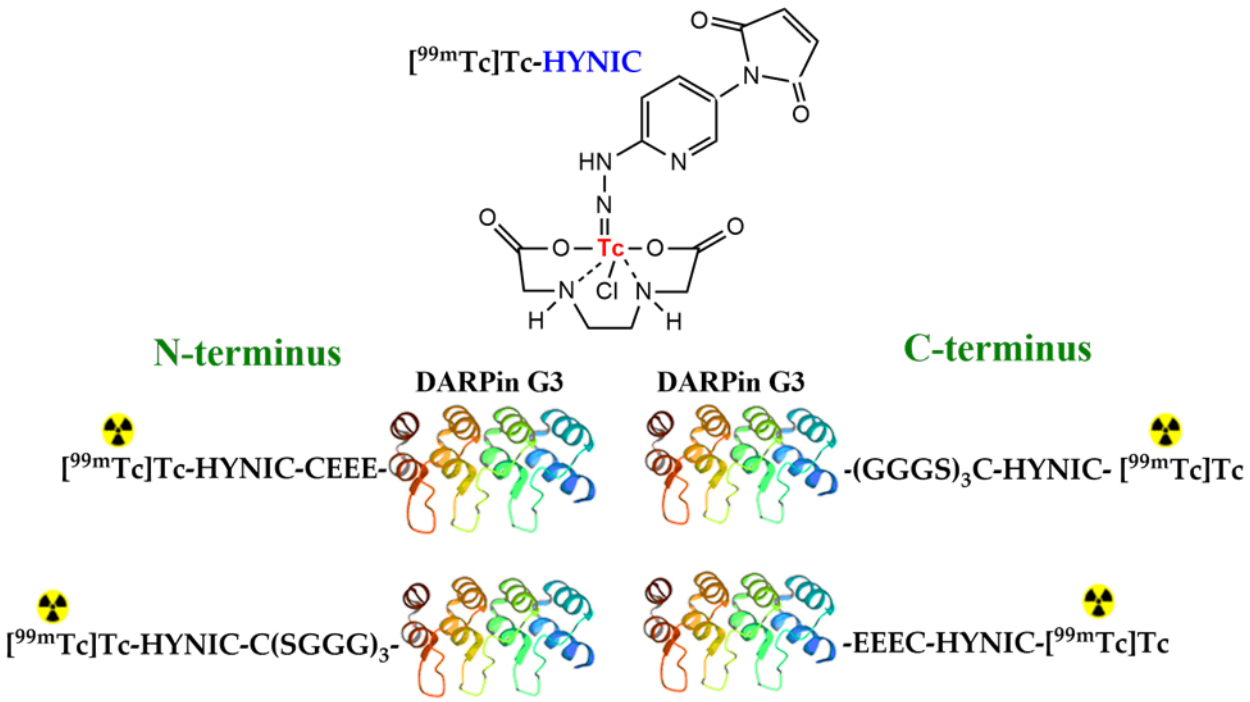


Рисунок 14 – Схематическое изображение хелатирующей группы HYNIC и белков, используемых в исследовании

Размещение хелатора HYNIC на N-конце белка [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 повысило радиохимический выход до 76% и 80% соответственно. РХВ для конструкций [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC составили 61% и 58% соответственно. Не было обнаружено значительного улучшения радиохимического выхода при изменении температуры инкубации с 60 °C на 80 °C и увеличении времени инкубации до 60 минут. Радиохимические выходы, наблюдаемые до обработки цистеином, оказались выше, чем после обработки цистеином, с увеличением приблизительно на 6-8%. Все соединения продемонстрировали высокую стабильность (радиохимическая чистота была больше 95%) при хранении в PBS в течение 4 ч в исследовании *in vitro* на стабильность.

Таблица 8 – Радиохимический выход, изолированный выход, максимальная специфическая активность и радиохимическая чистота после обработки цистеином для G3-E_3C-HYNIC, G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC, HYNIC-CE_3-G3 и HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3

	РХВ, %	Изолированный выход, %	РХЧ, %	Максимальная специфическая активность, МБк/мкг
[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3	76 ± 1	71 ± 2	97 ± 1	0,56
[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3	80 ± 2	72 ± 2	98 ± 1	0,61
[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC	61 ± 2	55 ± 3	97 ± 1	1,27
[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC	58 ± 2	52 ± 2	98 ± 1	1,33

3.4 Получение радиокомплекса [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3$-(HE)$_3$-DARPin G3

Мечение клинически апробированного варианта, содержащего глутамилгистидиновый хелатор, DARPin (HE)$_3$-G3 проводили по методике, описанной ранее [21]. Мечение проводили в две стадии; в первой стадии получали трикарбонильное ядро технеция-99м [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3^+$, затем проводили инкубацию с DARPin (HE)$_3$-G3 (рисунок 15). После завершения инкубации смесь инкубировали с 5000-кратным избытком гистидина для связывания ^{99m}Tc из нестабильных комплексов в структуре белка. Радиохимический выход составил 72 ± 0 % (рисунок 16). Очистка с использованием эксклюзионной хроматографии на колонках NAP-5 обеспечила радиохимическую чистоту 97%. Содержание гидролизованного восстановленного технеция находилось в диапазоне 0,6-1,6 %. Дополнительное исследование стабильности не проводили, так как стабильность комплекса многократно была подтверждена в прошлых исследованиях [20].

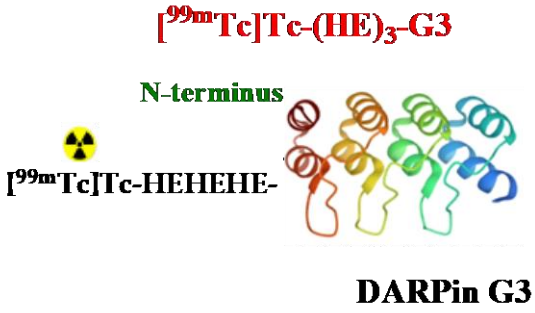


Рисунок 15 – Схематическое изображение радиокомплекса DARPin (HE)$_3$-G3 с [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3^+$

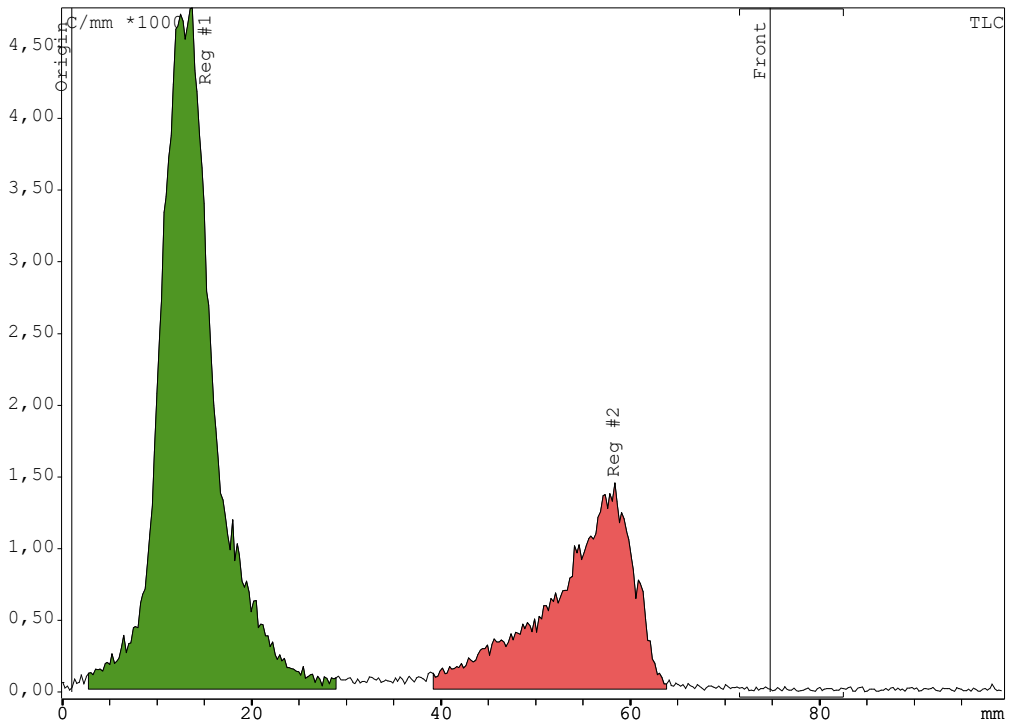


Рисунок 16 – Репрезентативная радиохроматограмма [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3$-(HE)$_3$-DARPin G3 (iTLC, подвижная фаза – PBS)

3.5 Результаты изучение *in vitro* ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с пептидными хелаторами

Исследование проводили в прямом сравнении с клинически апробированным вариантом [^{99m}Tc]Tc(CO)$_3$-(HE)$_3$-G3 для определения оптимального варианта.

Специфическую активность для вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами, меченных ^{99m}Tc, исследовали на клеточных линиях с различным уровнем экспрессии HER2: SK-BR-3 (+++) > SKOV-3 (+++) > PC3(+) [141, 142].

По данным *in vitro* исследований блокирование рецепторов путем добавления большого избытка немеченого DARPin G3 значительно снижало связывание радиомеченых вариантов DARPin G3 с клеточными линиями с высокой экспрессией HER2 (SKOV-3 и SK-BR-3, $p < 0,001$) (рисунок 17). Уровень связывания с SKOV-3 и SK-BR-3 был значимо ($p < 0,05$) выше, чем

уровень связывания с клетками PC-3. Аналогичные результаты так же продемонстрировал клинически апробированный вариант [^{99m}Tc]Tc-(HE)$_3$-G3.

Полученные результаты показывают, что связывание всех вариантов меченого DARPin G3 с клетками, экспрессирующими HER2, было рецептор-опосредованным, что доказывает HER2-специфичность связывания.

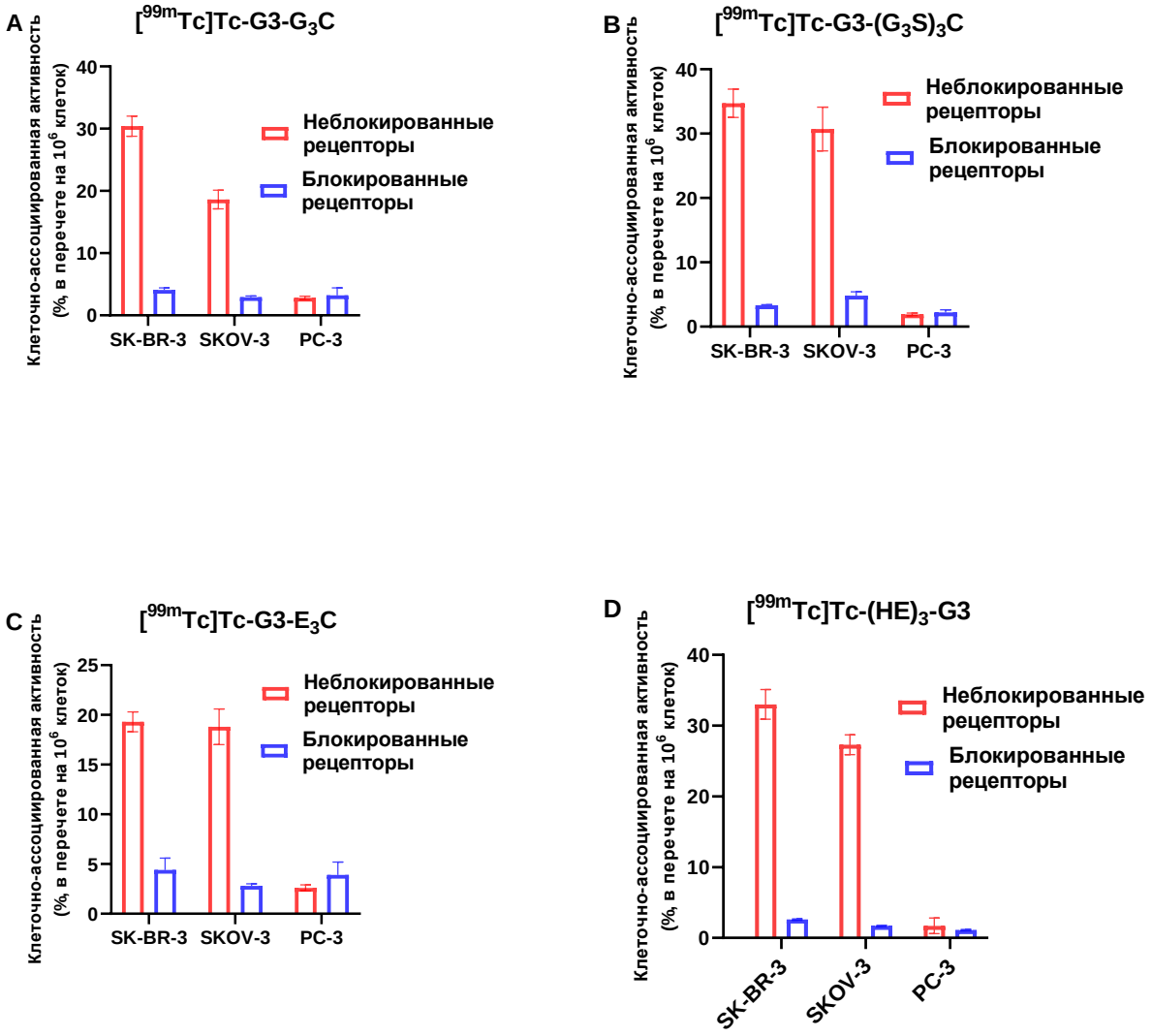


Рисунок 17 – Специфичность связывания радиокомплексов DARPin G3 и ^{99m}Tc с HER2-экспрессирующими клетками SK-BR-3, SKOV-3, (A) [^{99m}Tc]Tc-G3-G$_3$C, (B) [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C, (C) [^{99m}Tc]Tc-G3-E$_3$C, и (D) [^{99m}Tc]Tc-(HE)$_3$-G3. Для блокирования рецепторов к группам добавляли 100-кратный молярный избыток немеченого G3. Конечная концентрация радиомеченых соединений составляла 1 нМ. Данные представлены в качестве среднего значения трех образцов ± S

Исследование процесса **интернализации** показало, что общей чертой всех протестированных вариантов было относительно низкое количество интернализованной активности (до 25%) (рисунок 18). Однако характер удержания активности в клетках после связывания различался. Для [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C интернализованная активность достигала плато к 6 ч после начала инкубации. Общая клеточно-ассоциированная активность достигала максимума к 4 – 6 ч и затем снижалась. Такая картина характерна для неудерживаемых меток, когда метки от интернализованных и деградированных белков диффундируют из клеток. Тем не менее, высвобождение активности было медленным из-за медленной интернализации, поэтому можно ожидать незначительного снижения накопления в опухолях *in vivo* в течение клинически значимого времени визуализации (2 – 4 ч после инъекции). Для глутаматсодержащих хелаторов E_3C и $(HE)_3$ интернализованная активность постоянно увеличивалась, а выраженного снижения клеточно-ассоциированной активности в течение инкубации не наблюдалось. Медленное, но непрерывное увеличение интернализованной активности и постоянный уровень общей клеточно-связанной активности после 6 ч типично для медленно интернализуемых белков с удерживаемыми метками.

Следует отметить, что мы провели валидацию метода кислотной промывки, оценив интернализацию после инкубации на льду. Мы обнаружили, что некоторая клеточно-ассоциированная активность (менее 5%) все еще сохранялась с клетками после кислотной промывки. Поскольку интернализация является энергозависимым процессом, она не может происходить на льду. Скорее всего, кислотная промывка не удалила небольшую фракцию DARPin, которые были прочно связаны с HER2на клеточных мембранах. Это означает, что условия метода незначительно переоценивают интернализованную активность, но такое завышение не превышает 5%.

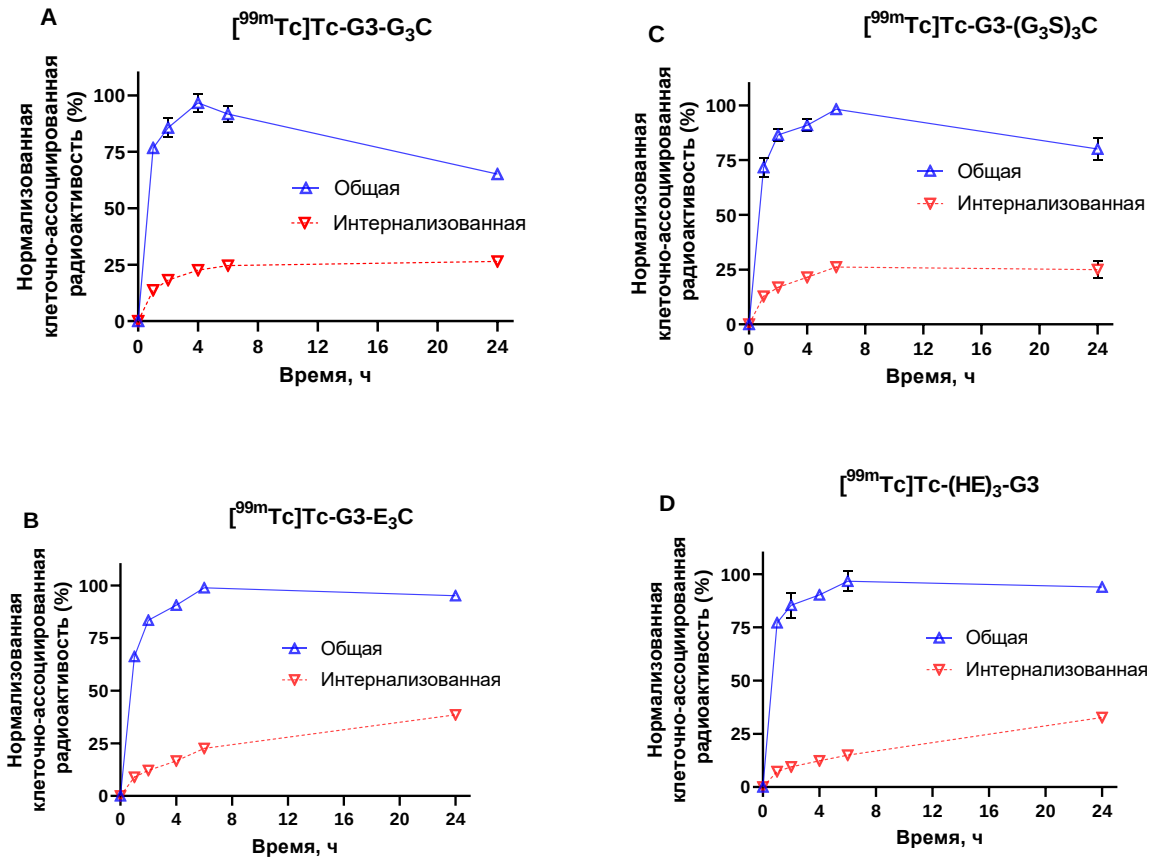


Рисунок 18 – Интернализация радиомеченых вариантов G3 в HER2-экспрессирующих клетках SKOV-3 *in vitro*. (A) [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, (B) [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C, (C) [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C, и (D) [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. Данные представлены как среднее из трех образцов ± S. Некоторые столбики ошибок не видны, так как они меньше точечных символов

Равновесную константу диссоциации (K_D) определяли методом насыщения с использованием клеточной линии рака яичников (SKOV-3). Результаты определения равновесной константы диссоциации представлены на рисунке 19 и в таблице 9. Четко прослеживается насыщаемый характер связывания [^{99m}Tc]Tc-меченых вариантов G3 с HER2-экспрессирующими клетками SKOV-3 (рисунок 19). Аппроксимация кривых насыщения связывания для четырех [^{99m}Tc]Tc-G3 показала, что K_D для связывания с HER2 на клетках SKOV-3 имеет значение в диапазоне от 1,9 до 5,0 нМ. Вариант [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 обладал значимо ($p < 0,05$) более высоким сродством (более низким K_D), чем

другие варианты (Таблица 9). Количество сайтов связывания (B_{max}) было определено как (1,03-1,59)x10^6 сайтов связывания на клетку. Следовательно, афинность всех вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3 с пептидными хелаторам была определена на наномалярном уровне, что является достаточным значением для молекулярной визуализации HER2.

Таблица 9 – Результаты анализа кривой насыщения рецепторов для связывания [^{99m}Tc]Tc-меченого G3 с клетками SKOV-3 (K_D и B_{max})

	K_D, нМ	B_{max}, рец./клетка
[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C	3,3 ± 0,5	(1,59 ± 0,07)x10^6
[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$	4,1 ± 0,6	(1,49 ± 0,01)x10^6
[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C	5,0 ± 0,9	(1,03 ± 0,06)x10^6
[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3	1,9 ± 0,2	(1,22 ± 0,03)x10^6

**Параметры K_D и B_{max} были рассчитаны на основе кривых насыщения*

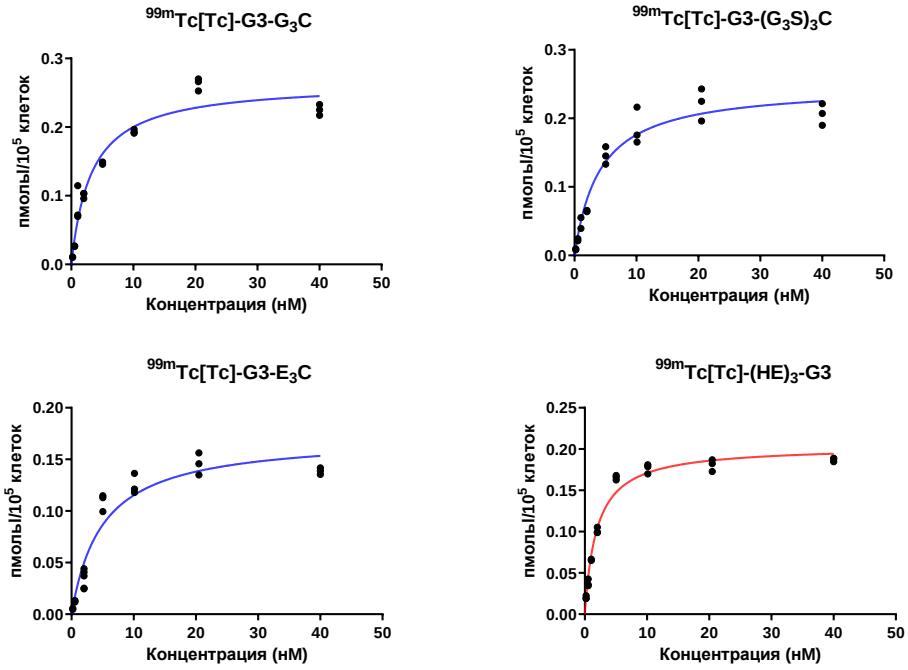


Рисунок 19 – Определение равновесных констант диссоциации (K_D) радиомеченных вариантов DARPin G3 при связывании с клетками SKOV-3, экспрессирующими HER2 *in vitro*. (A) [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, (B) [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$, (C) [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C, и (D) [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. Данные представлены в виде индивидуальных значений (n=3). Для некоторых концентраций точки перекрываются

3.6 Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств *in vivo* ^{99m}Tc-комплексов с DARPin G3 с пептидными хелаторами

Полные данные в виде таблиц с результатами всей статистической обработкой представлены в Приложение Б.

Оценку биораспределения вариантов G3, меченных ^{99m}Tc, проводили на мышах стока CD1 через 4 ч после инъекции (рисунок 20, Приложение Б, таблица Б1). Общей чертой всех вариантов было низкое сохранение активности в крови, мышцах и костях. Низкий уровень активности в желудочно-кишечном тракте с содержимым 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*.

Использование различных пептидных хелаторов сильно влияло на накопление в почках, печени и селезенке. Вариант [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 имел самое высокое сохранение активности в почках. 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-$(G_3S)_3C$. Вариант, содержащий G_3C, обеспечил значимо ($p < 0,05$) более низкое поглощение в почках, чем любой из других вариантов.

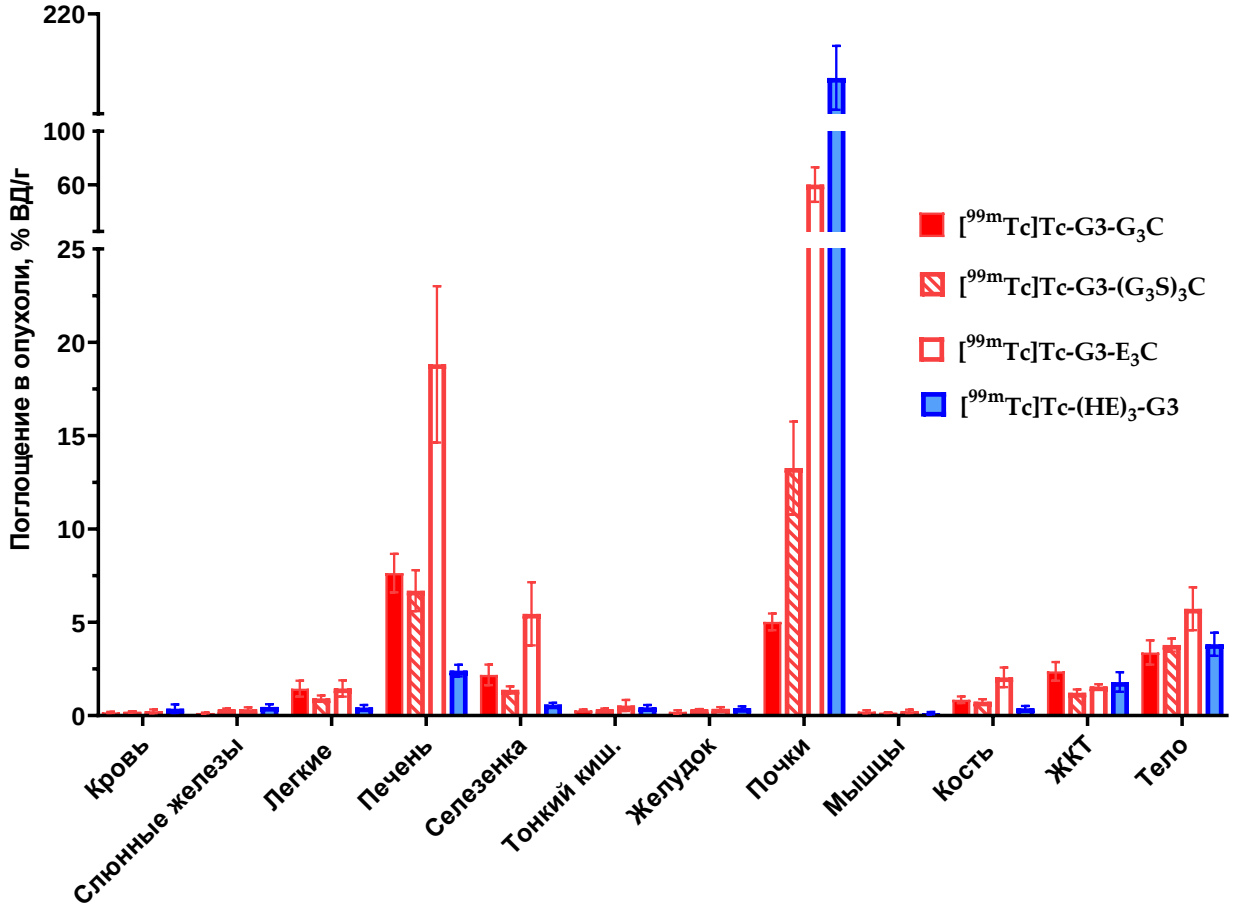


Рисунок 20 – Сравнительное биораспределение меченных ^{99m}Tc вариантов G3 с пептидным хелатором через 4 часа после инъекции у мышей CD1. Данные представлены в качестве среднего значения %ВД/г ± S для четырех мышей

Такие профили биораспределения (высокая почечная активность как для [^{99m}Tc]Tc-G3-E$_3$C, так и для [^{99m}Tc]Tc-(HE)$_3$-G3) согласуются с более ранними результатами для DARPins с невысвобождаемыми (удерживаемыми) метками в доклинических [21, 91, 126] и клинических [20] исследованиях. По-видимому, DARPins быстро интернализируются после почечной реабсорбции, а удерживающий характер метки обеспечивает ее длительное удержание в почках. Применение широко используемых методов блокирования почечной реабсорбции (инъекция катионных аминокислот или гелофузина) оказалось безуспешным в случае меченых DARPins [143]. Низкая почечная активность для [^{99m}Tc]Tc-G3-G$_3$C и [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C наиболее вероятно является результатом быстрой интернализации после реабсорбции и высвобождения

радиометаболитов из неудерживаемых меток. Эти результаты согласуются с тем, что DARPins, меченные неудерживаемым радиоактивным йодом, имеют низкую почечную задержку активности [91, 126, 144, 145]. Важно отметить, что, хотя высокая почечная реабсорбция и удержание нежелательны, высокое почечное поглощение не препятствует обнаружению костных метастазов в поясничной области с использованием молекул аффибоди [86].

Накопление в печени [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C (18,8 ± 4,2 %ВД/г) было самым высоким, а поглощение [^{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 легких, селезенке и костях ($p < 0,05$). Очень высокое поглощение печенью [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C является нежелательным фактором. Для визуализации HER2 (частые метастазы в кости, печень, легкие, брюшину [146 – 149];) агенты с низким поглощением в этих органах критически важны, поэтому [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C не соответствует этому требованию.

Включение отрицательно заряженных аминокислот снижает поглощение меченых белков в печени: например, хелатор $(HE)_3$ снижал накопление в печени у DARPins, нацеленных на HER2 и EpCAM, по сравнению с аналогами, содержащими гексагистидин (His6) [21, 145], что согласуется с данными для DARPin G3, меченного ^{111}In на C-конце с использованием хелатора DOTA [88].

Увеличение отрицательного заряда N-конца также снижало накопление в печени у радиоактивно меченных аффибоди [150]. Вероятно, избыточный положительный заряд локально на N-конце G3 критичен для удержания в печени, и его нельзя компенсировать добавлением отрицательных глутаматов на C-конце. Одним из возможных решений было бы размещение цистеинсодержащего хелатора на C-конце для мечения и $(HE)_3$-тага на N-конце для модификации биораспределения, как тестировалось для аффибоди, меченных оксотехнецием [151].

Данные о высоком накоплении в печени побудили нас исключить [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C из оценки на мышах с опухолями. Скорее всего, высокое поглощение печенью также относится и к [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C, но в этих случаях ^{99m}Tc быстро высвобождается из печени так же, как и из почек. Таким образом, биораспределение вариантов, содержащих G_3C и $(G_3S)_3$C, является благоприятным для разработки препаратов для визуализации HER2. Биораспределение этих вариантов сравнивали с биораспределением [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 у иммунодефицитных мышей с ксенотрансплантатами опухолей, экспрессирующих HER2.

Для определения таргетных свойств *in vivo* вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, а также оценке биораспределения у мышей с привитыми опухолями раковых клеток человека использовали иммунодефицитных мышей линии Nu/j. В качестве ксенотрансплантатов с высоким уровнем экспрессии HER2 использовали клетки линии SKOV-3, с низкой – PC-3.

Результаты специфического накопления активности в ксенотрансплантатах представлены на рисунке 21 и в Приложение Б, таблица Б2. Поглощение в ксенотрансплантатах SKOV-3 было значимо ($p < 0,005$, ANOVA) выше, чем в ксенотрансплантатах PC-3 (рисунок 21). Это свидетельствует о том, что уровень поглощения 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. Поглощение [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C в ксенотрансплантатах SKOV-3 через 4 ч после введения существенно не отличалось ($p > 0,05$, односторонний ANOVA). Это может быть объяснено сочетанием удерживаемого поведения метки [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, обеспечивающего лучшее удержание, и более высокой аффинностью [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 по сравнению с аффинностью [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C.

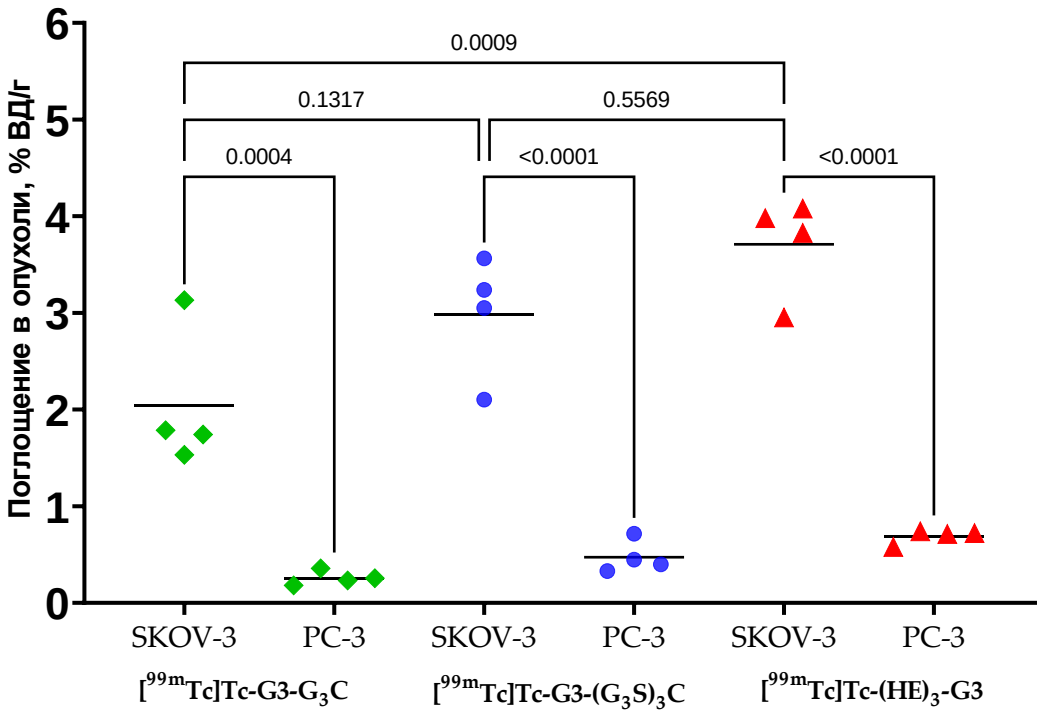


Рисунок 21 – Поглощение [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C (A), [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C (B) и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 (C) в ксенотрансплантатах SKOV-3 (высокая экспрессия HER2) и PC-3 (низкая экспрессия HER2) у мышей Nu/j через 4 ч после введения. Данные представлены как среднее значение %ВД/г ± S для четырех мышей

Сравнение биораспределения [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 у мышей Nu/j, несущих ксенотрансплантаты SKOV-3, показано на рисунке 22 и в Приложение Б, таблица Б2. Все варианты демонстрировали преимущественно почечный клиренс. Как и ожидалось, [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 продемонстрировал высокое сохранение активности в почках (163 ± 19 %ВД/г у мышей Nu/j, с привитыми ксенотрансплантатами SKOV-3). Поглощение [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 в печени и селезенке было значимо ($p < 0,05$, односторонний ANOVA) ниже, чем поглощение вариантов с пептидными хелаторами. Накопление в печени [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C не имело значимой разницы. Кроме того, вариант [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 имел наименьшее поглощение в легких, селезенке и костях ($p < 0,05$, односторонний ANOVA). Накопление в здоровых органах у иммунодефицитных мышей

(рисунок 22) хорошо согласуется с данными по биораспределению у мышей CD1 (рисунок 20).

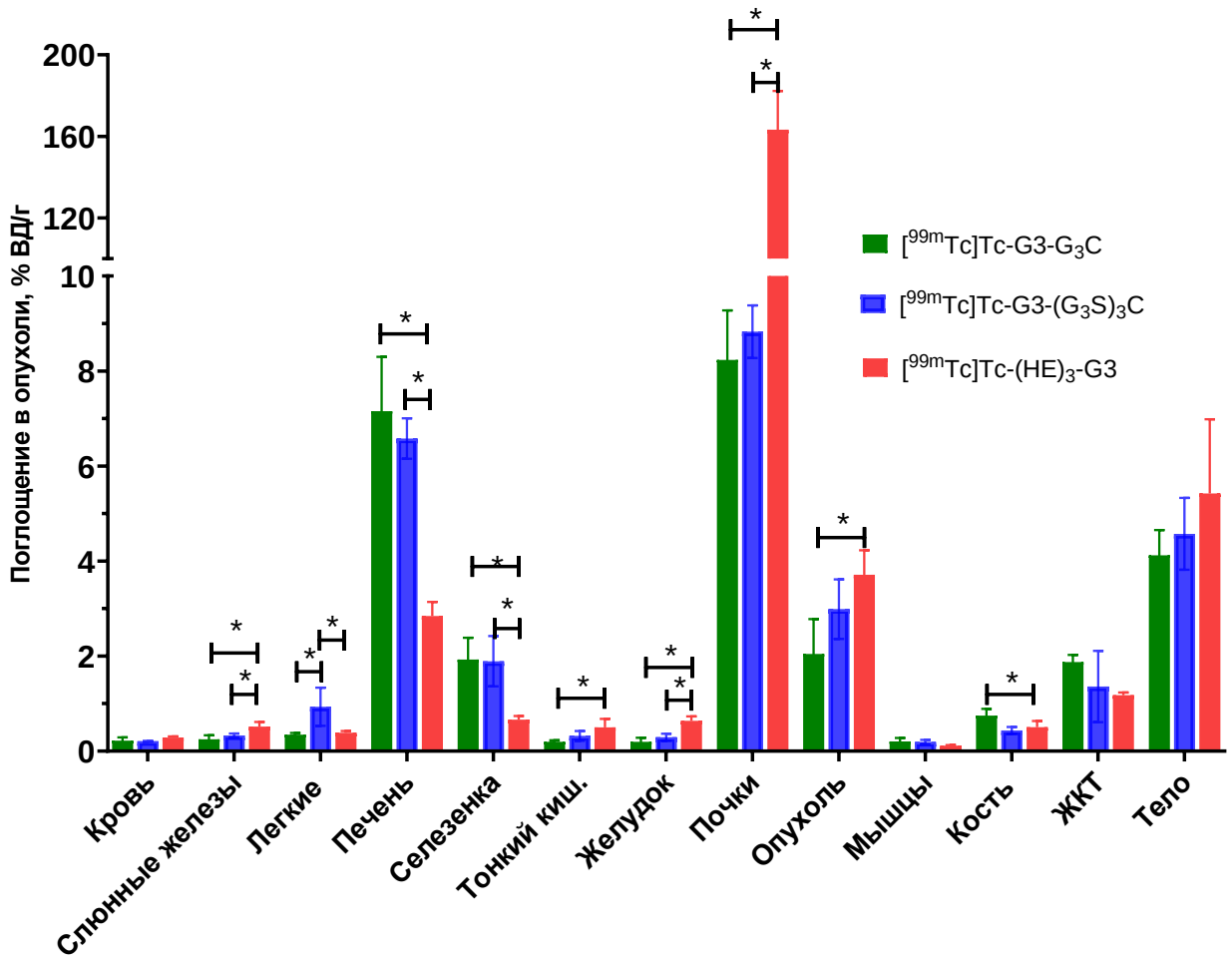


Рисунок 22 – Сравнительное биораспределение [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 через 4 ч после введения у мышей Nu/j, несущих HER2-экспрессирующие ксенотрансплантаты SKOV-3. Данные представлены как среднее значение %ВД/г ± S для четырех мышей. Данные по остальным частям ЖКТ с содержимым и остальным частям тела представлены как %ВД на весь образец. Звездочками отмечены значимые различия ($p < 0,05$, односторонний ANOVA)

Соотношение опухоли к органу для [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 через 4 ч после введения мышам Nu/j, несущим ксенотрансплантаты SKOV-3, показано на рисунке 23 и в Приложение Б, таблица Б3. При прямом сравнении [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 обеспечил значимо ($p < 0,05$,

односторонний ANOVA) более высокое соотношение опухоли к печени, опухоли к селезенке, опухоли к легкому и опухоли к мышце, чем оба варианта с пептидными хелаторами. И наоборот, соотношение опухоли к почке было значительно хуже для варианта, содержащего $(HE)_3$-хелатор. Для обеспечения высокой чувствительности визуализации соотношение концентраций радиоактивности между опухолью и органами, где часто образуются метастазы (печень, легкие, кости, желудочно-кишечный тракт), должно быть как можно выше. [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 обеспечивает значимо ($p < 0,05$) более высокие значения соотношения опухоль/орган для легких и печени, чем оба цистеинсодержащих варианта, и более высокие значения для костей, чем [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C (рисунок 23).

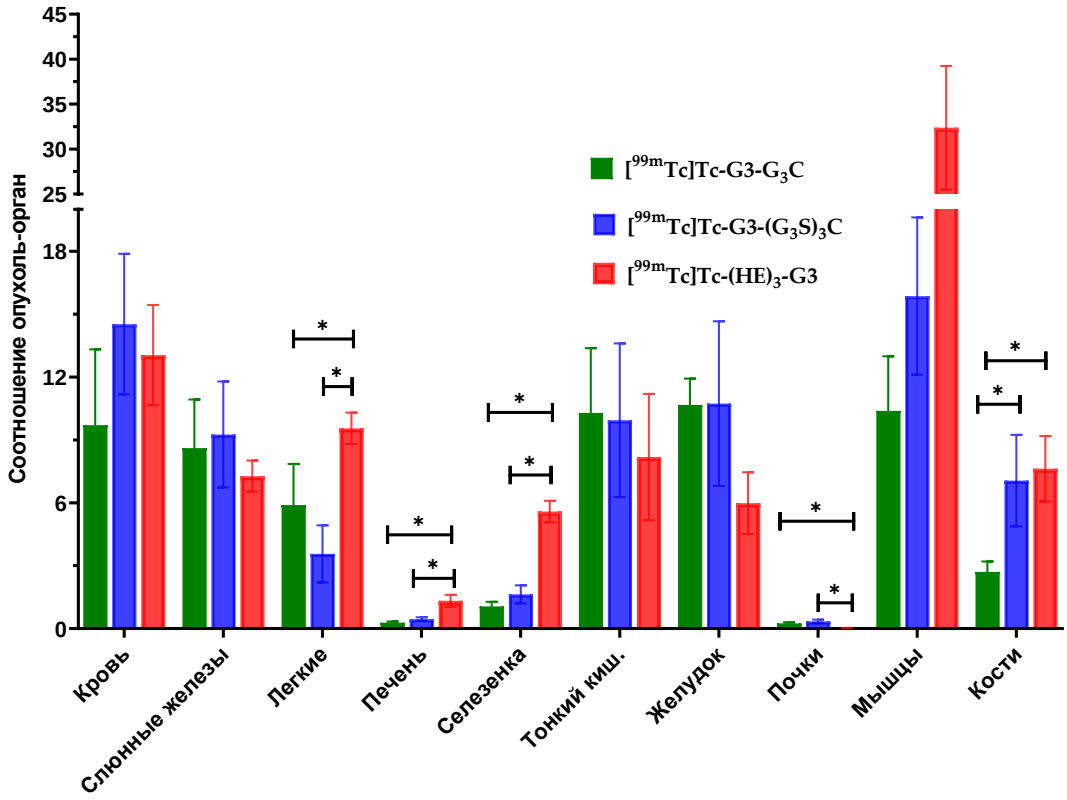


Рисунок 23 – Отношение опухоли к органу для [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 через 4 ч после инъекции у мышей Nu/j, несущих HER2-экспрессирующие ксенотрансплантаты SKOV-3. Данные представлены как среднее значение %ВД/г ± SD для четырех мышей. Звездочками отмечены значительные различия ($p < 0,05$, односторонний ANOVA)

Результаты экспериментальной визуализации (Рисунок 24) согласуются с данными биораспределения. Ксенотрансплантаты SKOV-3 четко визуализировались с помощью всех ^{99m}Tc-меченых DARPins. Все радиомеченые варианты G3 способны различать ксенотрансплантаты SKOV-3 с высокой экспрессией HER2 и ксенотрансплантаты PC-3 с низкой экспрессией HER2. Поглощение активности в почках было заметно выше для [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 по сравнению с двумя другими вариантами.

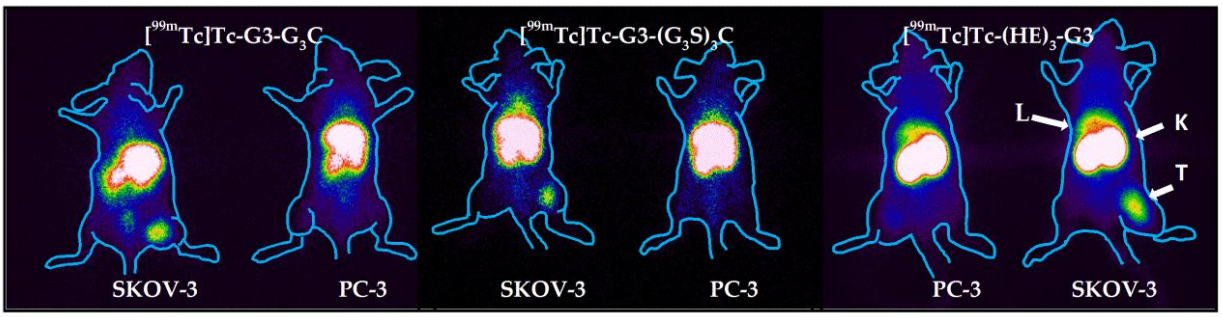


Рисунок 24 – Визуализация с помощью гамма-камеры экспрессии HER2у мышей Nu/J, несущих ксенотрансплантаты SKOV-3 и PC-3, с использованием [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 через 4 ч (10 мкг, 8 МБк). L – печень, К – почки, Т – опухоль. Контуры были получены из цифровой фотографии и наложены на изображения для облегчения интерпретации

Таким образом, предложенные варианты DARPin G3 с пептидными хелаторами уступают клинически апробированному [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 на мышиной модели.

3.7 Результаты изучения *in vitro* ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на С-конце

Варианты DARPin G3 с HYNIC-хелатором на С-конце, так же, как и варианты с пептидным хелатором сравнивали с клинически апробированным вариантом DARPin $(HE)_3$-G3 для определения оптимального варианта.

Результаты анализа **специфичности** связывания *in vitro* (Рисунок 25) показали, что связывание всех меченых ^{99m}Tc вариантов DARPin G3-HYNIC с HER2-экспрессирующими клеточными линиями SK-BR-3, SKOV-3 и PC-3 было рецептор-опосредованным, поскольку насыщение рецепторов 100-кратным избытком немеченого белка DARPin G3 значимо ($p < 0{,}0002$) снижало связывание радиомеченых вариантов. Уровень связывания пропорционален экспрессии HER2 и в случае с клетками PC-3 с низкой экспрессией имеет самое низкое значение.

По сравнению с [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, все варианты [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC имели одинаковый уровень связывания с клетками с экспрессией HER2. Это указывает на отсутствие негативного влияния химии мечения ^{99m}Tc-HYNIC на свойства связывания с мишенью.

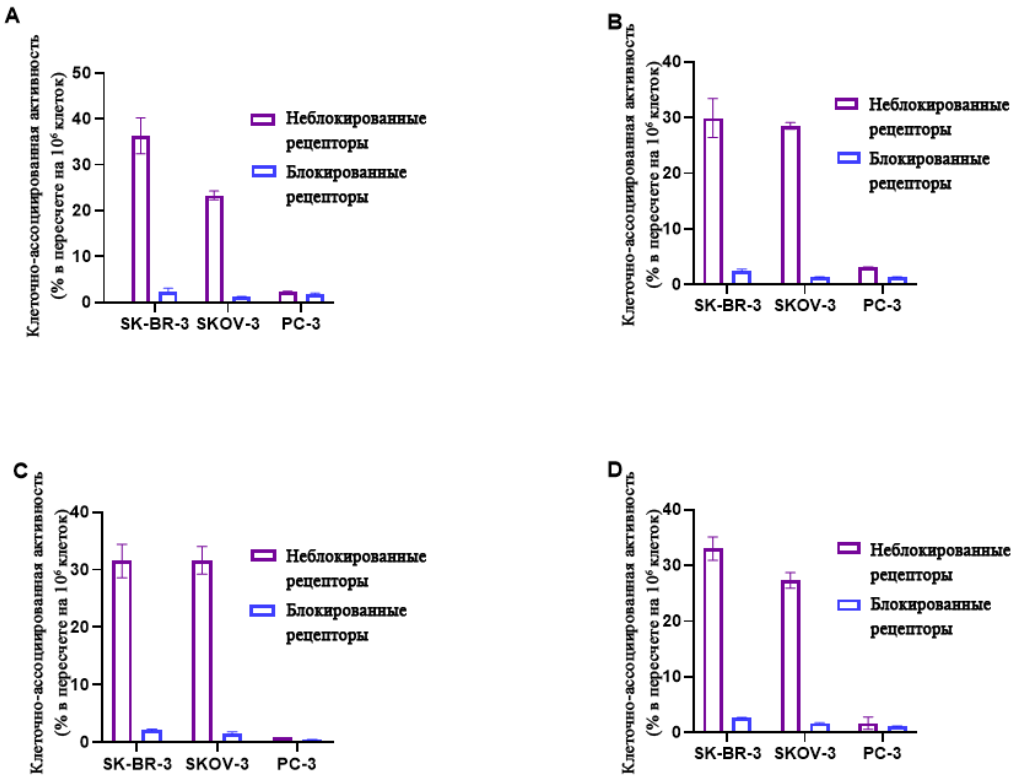


Рисунок 25 – Специфичность связывания радиомеченных вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC и варианта $(HE)_3$-G3, радиомеченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$ (A [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC, B [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC, C [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и D [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3) с HER2-экспрессирующими клетками SK-BR-3, SKOV-3 и PC-3 *in vitro*. Для блокирования к группам добавляли 100-кратный молярный избыток немеченых белков. Конечная концентрация радиомеченых соединений составляла 1 нМ. Данные представлены в качестве средних

Данные об **аффинности** связывания трех вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 к клеткам SKOV-3, экспрессирующими HER2, представлены в таблице 10 и на рисунке 26. Для меченых вариантов DARPin G3 на клетках SKOV-3, экспрессирующих HER2, были получены кривые насыщения связывания. Специфичность взаимодействия подтверждена конкурентным ингибированием 50-кратным молярным избытком немеченого DARPin G3 (Рисунок 26). Аппроксимация кривых насыщения связывания для меченных вариантов DARPin G3 показала, что K_D составляет от 0,6 до 2,3 нМ, а

B_{max} – (0,91-1,22) × 10^6 сайтов связывания на клетку. Вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC имел значительно меньшее значение K_D (0,60 ± 0,15 нМ), чем другие варианты (таблица 10, $p < 0,05$, t-тест). Таким образом, все меченые ^{99m}Tc варианты G3 демонстрируют наномолярную аффинность, причем вариант с $(G_3S)_3$C-HYNIC обладает достоверно более высокой аффинностью.

Таблица 10 – Анализ насыщения связывания меченых соединений [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC и $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$ с клетками SKOV-3*

	K_D, нмоль	B_{max}, рецепторы/клетка
[^{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	0,6 ± 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-$(HE)_3$-G3	1,9 ± 0,2	(1,22 ± 0,03) x 10^6

**Параметры K_D и B_{max} были рассчитаны на основе кривых насыщения*

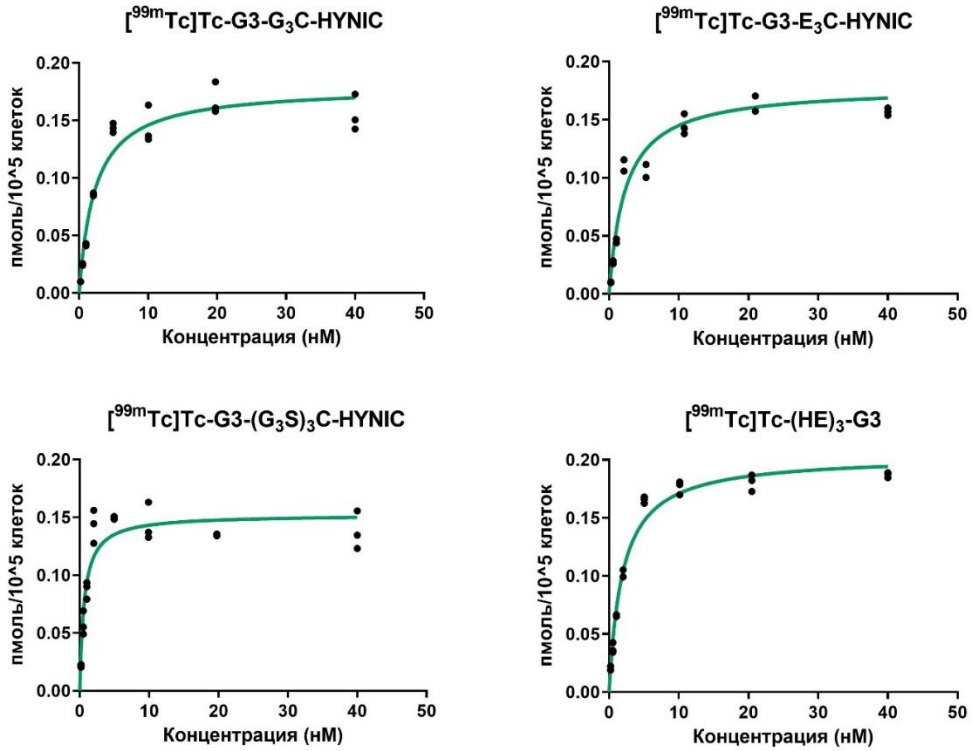


Рисунок 26 – Определение равновесных констант диссоциации (K_D) радиомеченных вариантов DARPin G3 при связывании с клетками SKOV-3, экспрессирующими HER2 *in vitro*. Данные представлены в виде индивидуальных значений (n=3). Для некоторых концентраций точки перекрываются

Скорость интернализации оценивали на клетках SKOV-3. Для этого клетки инкубировали с вариантами G3, меченными ^{99m}Tc, в течение 24 ч и измеряли мембраносвязанную и интернализованную радиоактивность в заданные временные точки (рисунок 27). Клеточно-ассоциированная активность и интернализованная активность увеличивались со временем для трех вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]-Tc-G3-E_3C-HYNIC, тогда как для [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 максимальная клеточно-ассоциированная активность была достигнута через 6 ч после инкубации и оставалась на том же уровне до 24 ч.

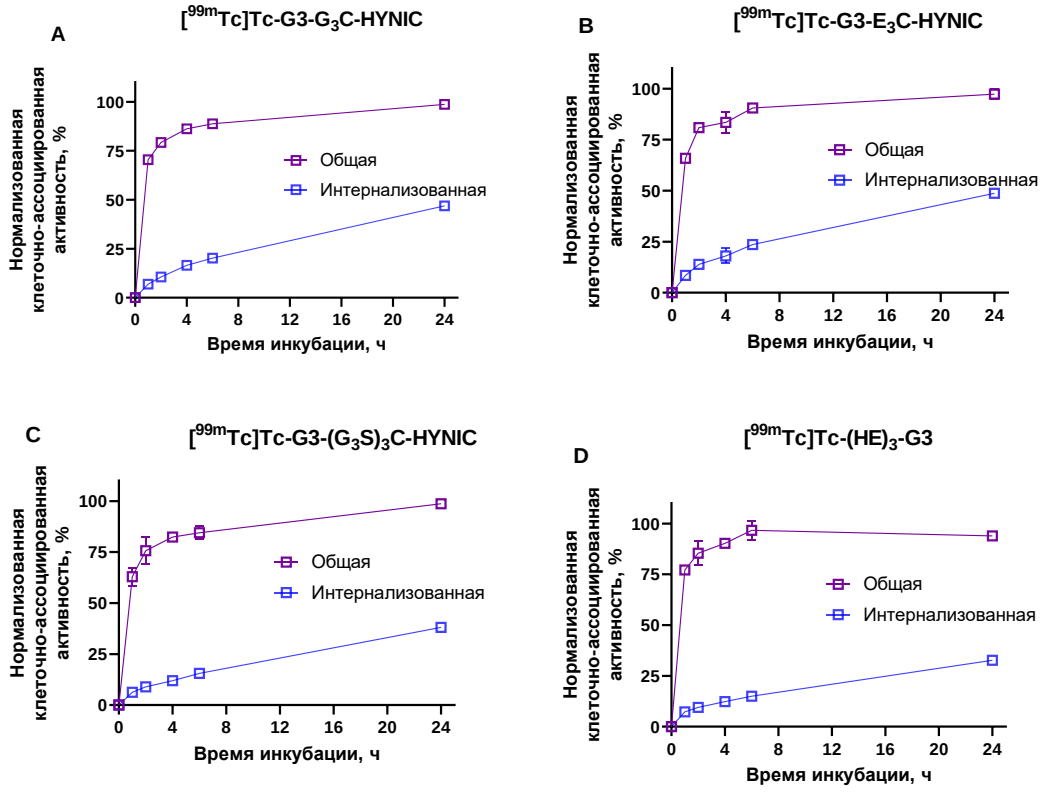


Рисунок 27 – Интернализация радиомеченных вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC и варианта $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, с клетками SKOV-3 (A – [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC, B – [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC, C – [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и D – [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3). Данные представлены в качестве средних значений ± S для трех образцов. Некоторые точки данных могут быть не видны из-за наложения

После инкубации в течение 4 ч интернализованная активность для вариантов [^{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 достигла 17 ± 0, 18 ± 4, 12 ± 1 и 12 ± 0 % от общей клеточно-ассоциированной активности в клетках SKOV-3, соответственно. После инкубации в течение 24 ч интернализованная активность для вариантов с G_3C-HYNIC, E_3C-HYNIC и $(G_3S)_3$C-HYNIC достигала 47 ± 1, 49 ± 1 и 38 ± 1 % от общей клеточно-ассоциированной активности в клетках SKOV-3, соответственно. Следует отметить, что [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 обладал несколько меньшей интернализованной активностью – около 33 ± 2 % интернализовалось к 24 ч по сравнению с другими вариантами.

В целом, интернализованная активность для всех меченых ^{99m}Tc вариантов, включая [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, была почти в 3 раза ниже через 4 ч по сравнению с 24 ч. Соответственно, скорость интернализации всех вариантов была относительно низкой, и, как было показано ранее [144], медленно интернализуемые радиоконъюгаты обеспечивают лучшее удерживание активности в опухолях. Эти данные подтверждают удерживаемый характер меток [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC: радиометаболиты не диффундируют через клеточные мембраны и удерживаются внутри клеток после HER2-опосредованного эндоцитоза и лизосомальной деградации.

В исследовании вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами, меченных [^{99m}Tc]Tc=O, паттерны интернализации различались для глицин-содержащих и глутамат-содержащих вариантов. Глицинсодержащие варианты [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C имели более высокую скорость интернализации (около 22% к 4 часам), чем глутаматсодержащие варианты [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C (12 – 15% к 4 часам). В то же время интернализованная активность для глицинсодержащих вариантов достигала примерно 25% к 24 часам, а для глутаматсодержащего варианта [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C – примерно 40%. Следовательно, интернализация новых вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC схожа только с вариантом [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C.

3.8 Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на С-конце

Полные данные в виде таблиц с результатами всей статистической обработкой представлены в Приложение В.

Биораспределение вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC и $(HE)_3$-G3, меченного ^{99m}Tc, изучали параллельно на мышах стока CD1 через 4 ч после инъекции (рисунок 28 и Приложение В, таблица В1). Вариант [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 показал быстрое элюирование из крови через почки с последующей почечной реабсорбцией и высокое удержание активности в почках. При этом накопление в почках вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC (111 ± 16 %ВД/г) и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 (143 ± 39 %ВД/г) не имело статистически значимых различий ($p < 0,05$, t-тест). Этот результат согласуется с предыдущими данными для глутаматсодержащих DARPins с удерживаемыми метками в доклинических [21] и клинических [20] исследованиях [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. 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. Более того, 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, так и [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC, при чем захват почками в 3 раза ниже, чем у [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC. Такое распределение может быть объяснено тем, что глицин-содержащие варианты быстро высвобождают радиометаболиты из почек, что типично для неудерживаемых радиоактивных меток.

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. Высокое поглощение [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C в

печени было также обнаружено в исследовании вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами. Эти результаты были несколько неожиданными. Описанные исследования с другими каркасными белками показали, что увеличение гидрофильности и отрицательного заряда внешнего заряда по средствам аминокислотных боковых цепей снижает захват в печени аффибоди [152]. Положительный эффект отрицательно заряженных глутаматных линкеров на снижение захвата печенью был описан в нескольких исследованиях других конструкций, например, содержащих альбумин-связывающий домен (ABD). Так, сравнительное исследование биораспределения меченных радионуклидами конъюгатов аффибоди-ABD-DM1, нацеленных на HER2, показало, что добавление глутаматов к С-концу ABD снижает захват в печени, сохраняя захват в опухоли [153].

Объяснением увеличенного накопления в печени для [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C может быть тот факт, что использование сильно удерживаемой метки [^{99m}Tc]Tc-E_3C увеличивает захват активности в печени. Однако данные об интернализации HYNIC-содержащих вариантов DARPin G3 (рисунок 27) показывают, что интернализованная активность [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC были примерно равны, что говорит о сходном внутриклеточном характере удерживания. Таким образом, разница в концентрации активности в печени была скорее различием в захвате конструкций, чем в удержании активности. Эти результаты указывают на то, что включение нескольких аминокислот с отрицательно заряженными боковыми цепями на С-конце DARPin G3 облегчает некоторые внемишенные взаимодействия, что приводит к более высокому захвату почками.

Эта гипотеза согласуется с данными исследования [21], показавшего, что размещение глутамат-содержащей метки $(HE)_3$ на С-конце вместо N-конца приводило к более чем двукратному увеличению захвата в печени через 24 ч после инъекции. В радионуклидной молекулярной визуализации крайне важно, чтобы агент мог визуализировать метастазы, в том числе в печени; следовательно, варианты DARPin G3 с глутаматами на С-конце не подходят для

дальнейшего изучения. Стоит отметить, что [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC имел сравнимый, хотя и несколько более высокий, захват в печени, чем [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. В исследовании на вариантах DARPin G3 с пептидными хелаторами меченный ^{99m}Tc 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, содержащий $(G_3S)_3$C-HYNIC, имел статистически значимо ($p < 0,05$, ANOVA) более низкий захват в слюнных железах и селезенке по сравнению с [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC.

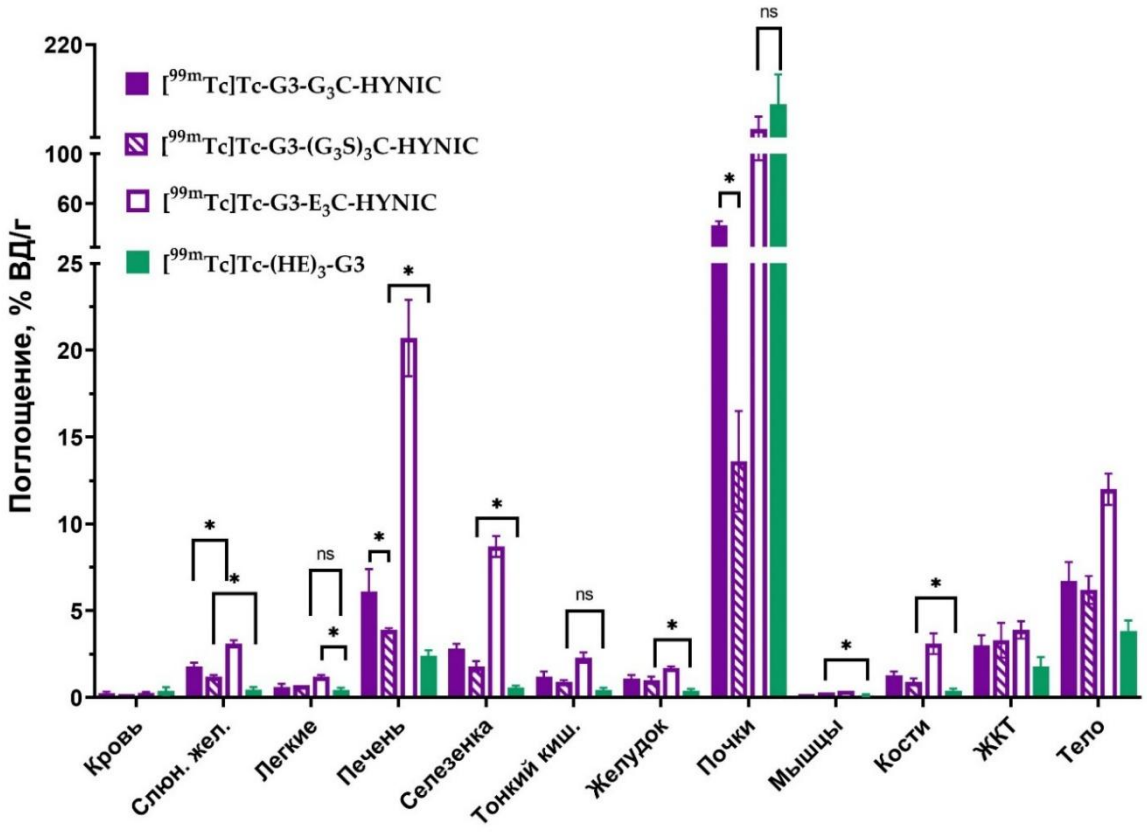


Рисунок 28 – Сравнительное биораспределение вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC и варианта $(HE)_3$-G3, меченных ^{99m}Tc, через 4 ч после инъекции у мышей стока CD1. Данные представлены как среднее значение % ВД/г ± S (n=4). Данные для остального желудочно-кишечного тракта с содержимым и остального тела представлены в виде % ВД на весь образец. Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ)

На основании этих результатов вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC был отобран для оценки таргетных свойств *in vivo* в сравнении с вариантом [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. Оценку таргетных свойств с HER2 для этих вариантов проводили на мышах Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3 (рисунки 29 и 30, Приложение В, таблица В2). Результаты исследования специфичности *in vivo* подтвердили HER2-специфичный захват варианта [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и варианта $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, так как захват был выше в опухолях SKOV-3 с высокой экспрессией HER2 по сравнению с опухолями PC-3 с низкой экспрессией HER2(рисунок 30). Оба варианта, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3, обеспечивали сходный уровень ассоциированной активности в опухолях SKOV-3 (3,1 ± 1,1 и 3,7 ± 0,5 %ВД/г, соответственно; $p > 0,05$, t-тест) через 4 ч после инъекции.

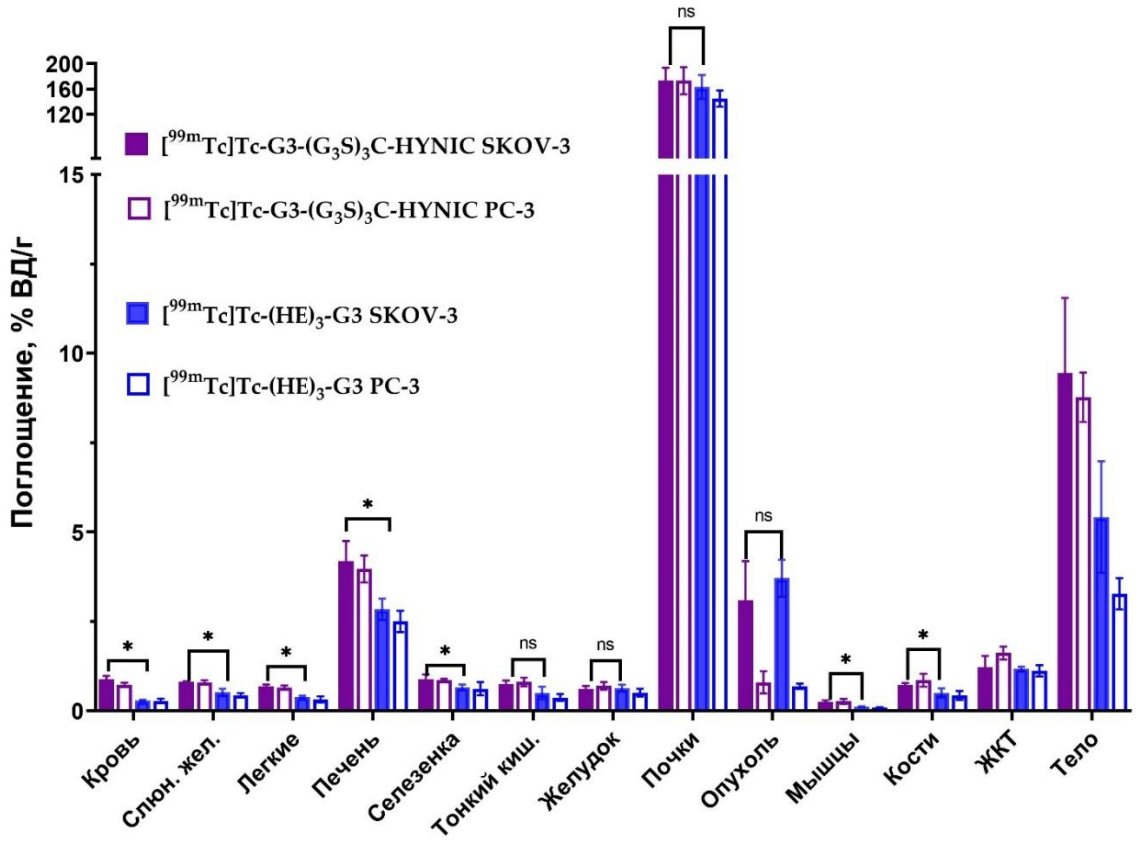


Рисунок 29 – Сравнительное биораспределение [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и варианта $(HE)_3$-G3, меченных [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, через 4 ч после инъекции у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3, экспрессирующими HER2. Данные представлены как среднее значение % ВД/г ± S (n=4). Данные для остальной части желудочно-кишечного тракта с содержимым и остального тела представлены в виде % ВД на весь образец. Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$, непарный t-тест)

При прямом сравнение биораспределения оба варианта показали высокое накопление в почках без значимых различий у мышей Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 (163 ± 19 %ВД/г и 173 ± 21 %ВД/г, соответственно, $p > 0,05$) (рисунок 29, таблицы Б2-Б3). Также не было значимых различий ($p > 0,05$, t-тест) в захвате этими вариантами в почках у мышей Nu/j с ксенотрансплантатами PC-3.

Захват в печени для вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 у мышей Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 составил 4,2 ± 0,6 %ВД/г и 2,8 ± 0,3 %ВД/г, соответственно. В целом, вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC демонстрировал статистически значимо ($p < 0,05$, t-тест) более высокий захват в крови, слюнных железах, легких, селезенке, мышцах и костях по сравнению с вариантом [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3. Исследования биораспределения выявили резкое различие в накоплении активности в почках [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC между мышами CD1 и Nu/j (рисунок 28, 29). Уровень связанной с почками радиоактивности был очень низким у мышей CD1 по сравнению с мышами Nu/j. Этот эффект может объясняться биохимическими и метаболическими различиями между линиями мышей, которые могут приводить к разной удержанию радиометаболитов в почках [^{99m}Tc]Tc-$(G_3S)_3$C-HYNIC. Обычно различия в удержании радиометаболитов описываются для одного и того же белка с разными типами меток (например, радиометаллы ^{111}In и ^{99m}Tc), но на одной линии мышей [154, 155].

В целом, биораспределение у мышей с ксенографтами показало, что оба варианта имеют низкий захват в нормальных органах, за исключением почек, причем у варианта [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 наблюдается несколько более низкий захват в крови, слюнных железах, легких, селезенке, мышцах и костях.

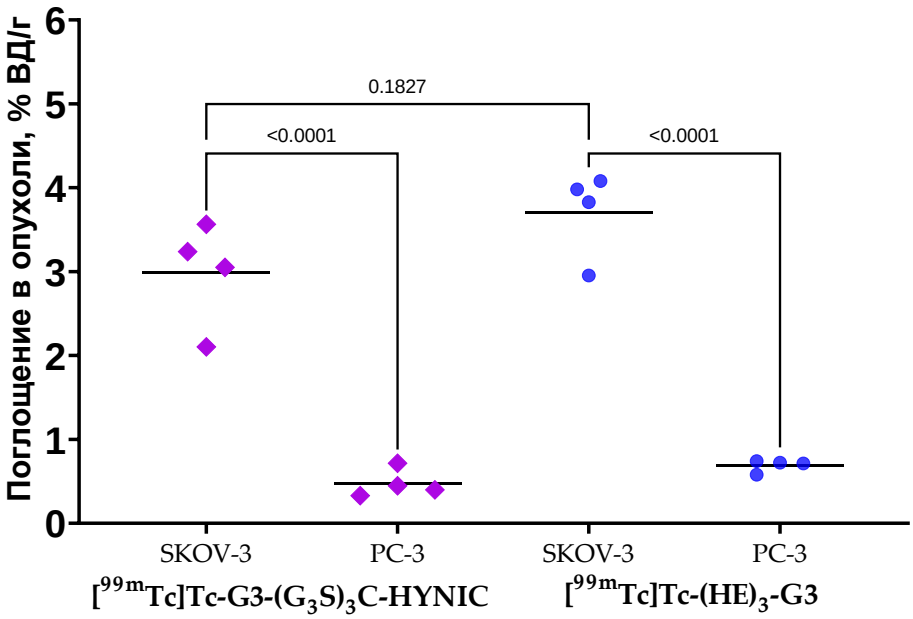


Рисунок 30 – Специфичность накопления в опухоли вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, через 4 ч после инъекции у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3, экспрессирующими HER2. Данные представлены как среднее значение %ВД/г ± S (n=4). Указаны точные значения p ($p < 0,05$, t-тест)p

Соотношения «опухоль/орган» для этих вариантов представлены на рисунке 31 и в Приложение В, таблица В3. При прямом сравнении [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC имел сравнимые, хотя и несколько более низкие, отношения опухоль/легкие (ниже в 1,7 раза), опухоль/селезенка и опухоль/печень (в 1,6 раза), чем [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3.

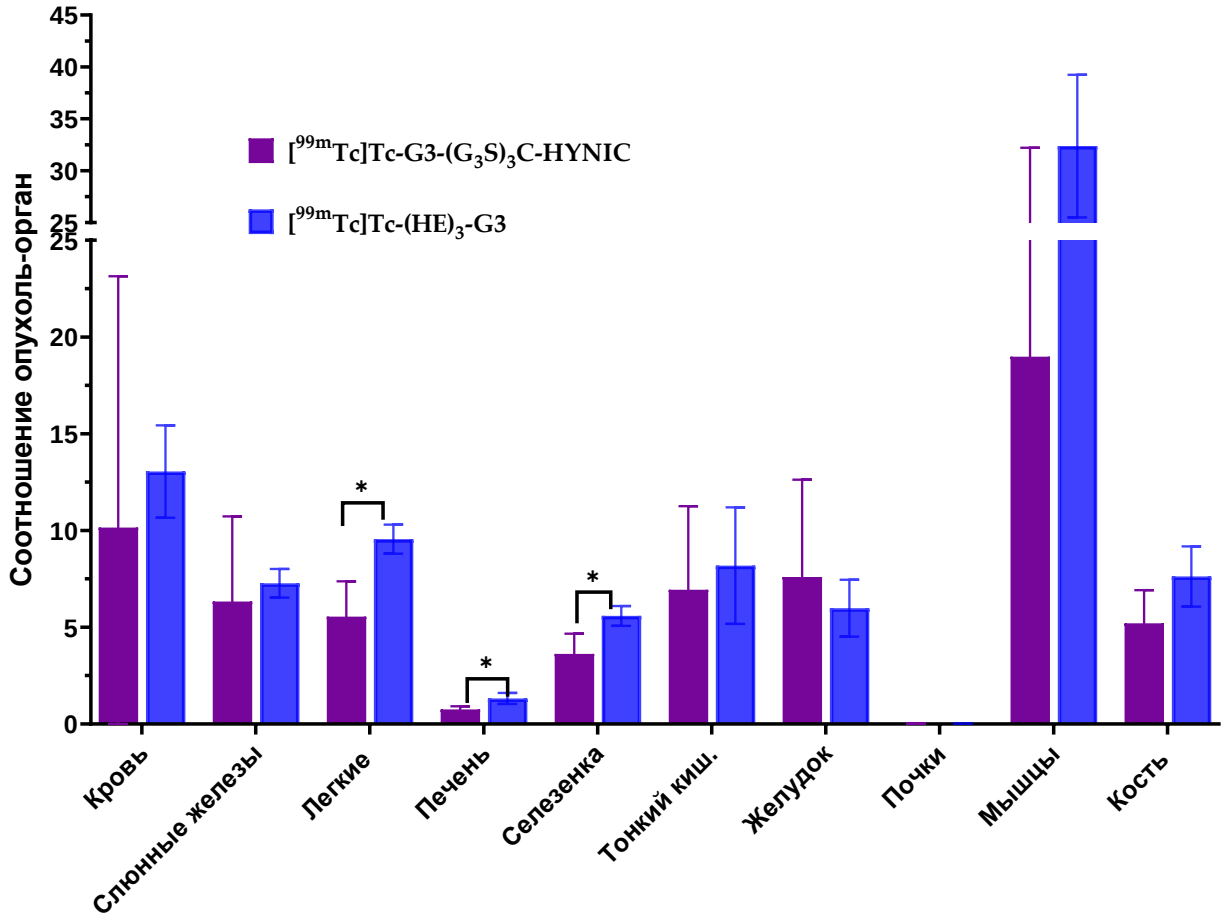


Рисунок 31 – Соотношения опухоль/орган для [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и варианта $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, через 4 ч после инъекции у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3, экспрессирующими HER2. Данные представлены как среднее значение % ВД/г ± S (n=4). Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$, t-тест)

Экспериментальная визуализация на гамма-камере подтвердила результаты исследования биораспределения *in vivo* (рисунок 32). Для прямого сравнения ксенотрансплантаты SKOV-3 и PC-3 визуализировали с использованием вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 (рисунок 32). Оба варианта имели более высокий захват в опухолях с высокой экспрессией HER2 (ксенотрансплантаты SKOV-3), чем в опухолях с низкой экспрессией HER2 (ксенотрансплантаты PC-3).

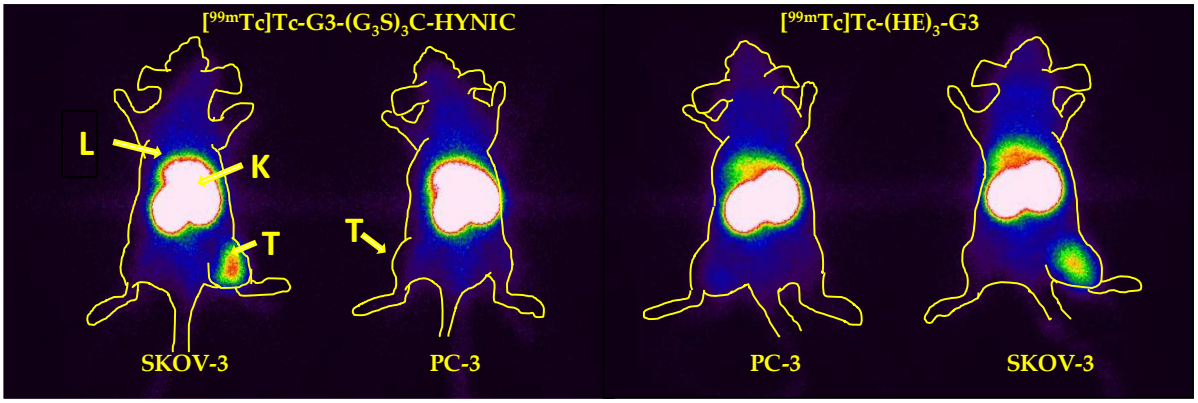


Рисунок 32 – Визуализация экспрессии HER2 на гамма-камере у мышей линии Nu/J с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3 с использованием [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 через 4 ч после инъекции (10 мкг, 7,7-7,8 МБк). Обозначения: L – печень, K – почки, T – опухоль. Контуры органов, полученные с цифровой фотографии, наложены на изображения для облегчения интерпретации

Сравнение данных этого исследования с данными для гомологичных вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами, меченных с использованием оксотехнеция, выявляет сильное влияние химии мечения на биораспределение и таргетные свойства. Так, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC через 4 ч после инъекции имел в 1,6 раза более низкий захват в печени и более чем в 2 раза более низкий захват в селезенке у мышей Nu/j по сравнению с [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C. Напротив, накопление в почках [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC было почти в 20 раз выше, а концентрация в крови – в 4 раза выше по сравнению с [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C. Это является существенным аргументом в пользу того, что хелатирующая группа влияет на захват DARPin G3 в нормальных тканях и на удерживание интернализованной активности.

3.9 Результаты изучение *in vitro* ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на N-конце

Проводили прямое сравнение **специфичности** вариантов DARPin G3 с HYNIC-хелатором на N- и C-концах. Все меченые N- и C-концевые варианты G3-HYNIC продемонстрировали значительное снижение поглощения в клетках PC-3 и других заблокированных группах клеток, предварительно обработанных 100-кратным молярным избытком немеченого DARPin G3 для блокирования рецепторов HER2, по сравнению с незаблокированными клетками SKOV-3 и SK-BR-3($p < 0,01$) (рисунок 33). Этот результат свидетельствует о высокой специфичности клеточного поглощения комплексов G3-HYNIC без различий между N- и C-концевыми вариантами. Более того, радиоактивная метка не нарушила специфичность связывания, что подтверждает потенциальную полезность этих комплексов для использования в качестве таргетного препарата для диагностики HER2-положительных опухолей.

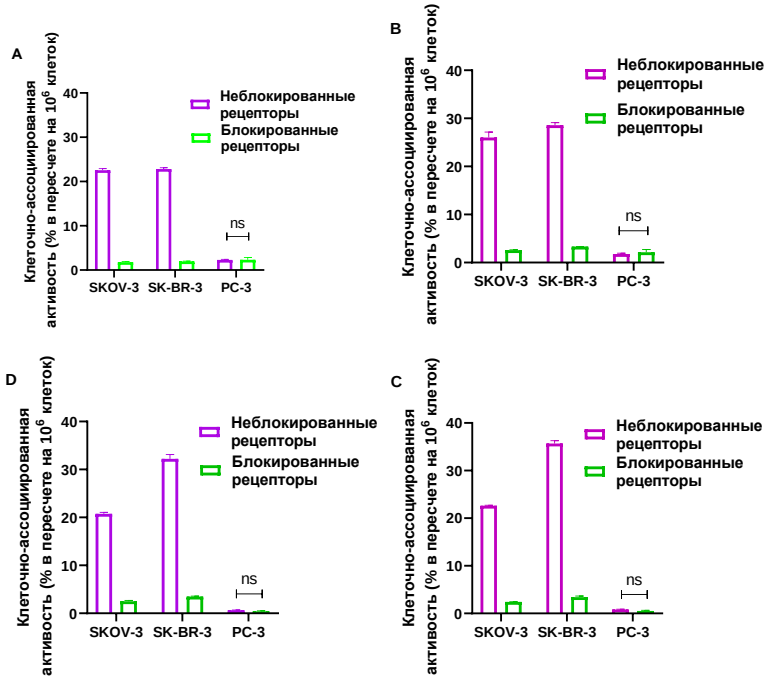


Рисунок 33 – Специфичность связывания *in vitro* (A) [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE$_3$-G3, (B) [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G$_3$S)$_3$-G3, (C) [^{99m}Tc]Tc-G3-E$_3$C-HYNIC и (D) [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C-HYNIC с клетками SKOV-3, SK-BR-3 и PC-3. Для блокирования рецепторов добавляли 200-кратный молярный избыток немеченого DARPin G3. Конечная концентрация меченых радиолигандных соединений составляла 1 нМ. Данные представлены как среднее значение для трех образцов ± S

Равновесную константу диссоциации (K_D) определяли для вариантов DARPin G3-HYNIC с N-концевой модификацией (рисунок 34 и таблица 11). Значение K_D для [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 составили (1,72 ± 0,25) нМ и (1,68 ± 0,16) нМ соответственно, а максимальное количество сайтов связывания находилось в диапазоне (1,33 до 1,45) × 10^6 рецепторных сайтов на клетку. Эксперимент показал, что константы равновесной диссоциации (значения K_D) для HER2-экспрессирующих клеток оказались сопоставимыми независимо от аминокислотного линкера.

Таблица 11 – Равновесные константы диссоциации (K_D) взаимодействия между меченными вариантами G3-HYNIC и экспрессирующими HER2 клетками SKOV-3. Данные представлены как среднее значение для трех образцов ± S

	[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3	**[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3**
K_D, нМ	1,68 ± 0,16	1,72 ± 0,25
B_{max}, рец/клетка	(1,45 ± 0,03) × 10^6	(1,33 ± 0,05) × 10^6

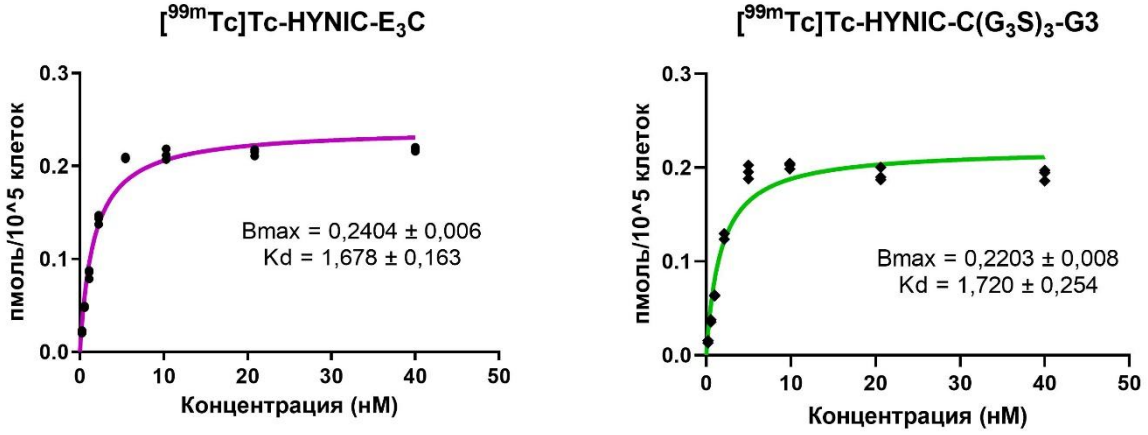


Рисунок 34 – Кривые насыщения меченных N-концевых вариантов G3-HYNIC (A) [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и (B) [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 с экспрессирующими HER2 клетками SKOV-3 *in vitro*

Скорость интернализации для новых меченых ^{99m}Tc N-концевых вариантов DARPin G3-HYNIC оценивали на экспрессирующих HER2 клетках SKOV-3 (рисунке 35). Связанная с клетками и интернализованная активность

увеличивалась со временем для обоих вариантов. После 4 ч инкубации интернализованная активность [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G_3S)$_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 уже достигла 18,8 ± 0,3 % и 14,8 ± 4,0 % соответственно от общей активности, связанной с клетками SKOV-3. После инкубации в течение 24 ч интернализованная активность [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G_3S)$_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 достигла 48,2 ± 1,5 % и 44,2 ± 7,2 % соответственно от общей активности, связанной с клетками SKOV-3. Такие значения интернализованной активности хорошо коррелируют с величинами для С-концевых вариантов G3-HYNIC.

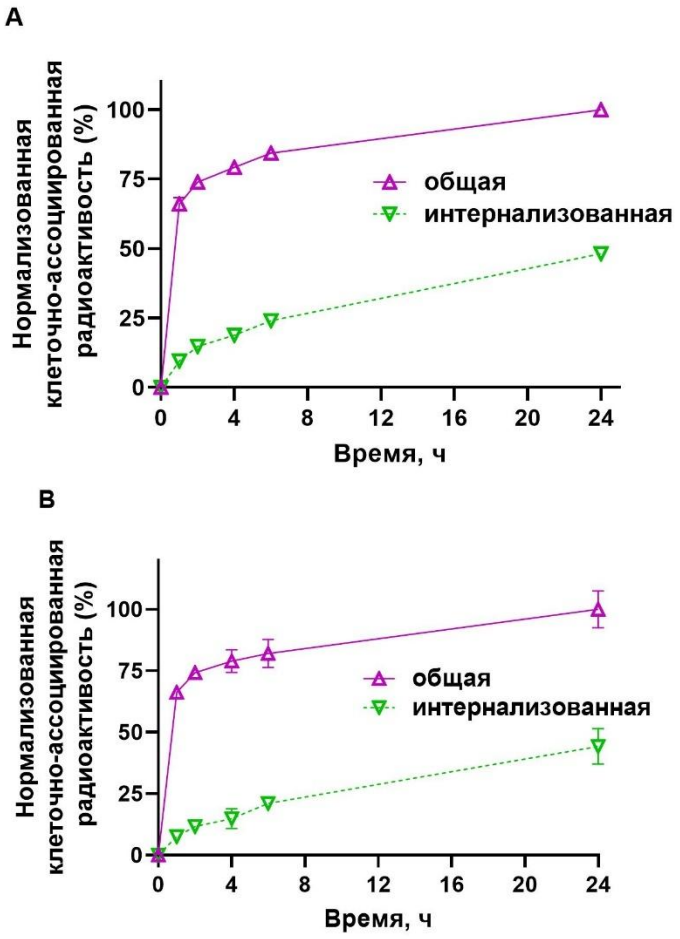


Рисунок 35 – Результаты оценки интернализации меченных N-концевых вариантов DARPin G3-HYNIC (A) [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3, (B) [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G_3S)$_3$-G3 экспрессирующими HER2 клетками SKOV-3 *in vitro*.

Данные представлены как среднее значение для трех образцов ± S. Некоторые полосы отклонений не видны, так как они меньше размеров символов точек

3.10 Результаты исследования биораспределения и таргетных свойств ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на N-конце

Полные данные в виде таблиц с результатами всей статистической обработкой представлены в Приложение Г.

Сравнительное биораспределение вариантов G3-HYNIC с HYNIC хелатором на N- или C-конце, меченных ^{99m}Tc, оценивали в здоровых мышах стока CD1 через 4 ч после инъекции (рисунок 36, Приложение Г, таблица Г1). Все варианты характеризовались низким удержанием активности в крови, низкое накопление в слюнных железах и желудке указывают на отсутствие высвобождения [^{99m}Tc]Tc-пертехнетата *in vivo*. Так же на основе результатов низкой удерживаемой активности в желудочно-кишечном тракте можно предположить, что все конструкции практически не выводятся с желчью. 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 [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3, 244 ± 14 %ВД/г и 262 ± 15 %ВД/г соответственно, демонстрировали достоверно более высокие уровни накопления активности ($p < 0,0001$), что представляет собой увеличение в 1,5 раза по сравнению с таковым для вариантов G3-HYNIC с C-концевой модификацией. Хотя высокая активность в почках не является оптимальным результатом, предыдущие исследования показали, что высокие уровни удержанной активности в почках не мешают визуализации костных метастазов

в поясничной области при введении анти-HER2 аффибоди-молекул [86]. Такое высокое поглощение является все-таки является нежелательным.

Захват в печени комплексов [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 был значимо ниже ($p < 0,0001$), чем у вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC. Значительное расхождение между полученными результатами и ранее полученными данными по удержанию активности в печени для [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC (17,2 ± 0,8 против 20,7 ± 2,2 %ВД/г) и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC (12,75 ± 1,57 против 3,9 ± 0,1 %ВД/г) было для нас неожиданным. Наблюдаемые различия могут объясняться иными условиями биораспределения, например, разной дозой белка на мышь, а также тем, что доза белка на мышь корректировалась по концентрации с использованием DARPin G3, неконъюгированного с HYNIC. В данном исследовании вводимая доза составляла 3 мкг меченных ^{99m}Tc конструкций DARPin G3-HYNIC, тогда как в исследовании вариантов G3-HYNIC первой генерации использовалась более высокая доза – 5 мкг. Использование для приготовления формуляции мышам DARPin G3, неконъюгированного с хелатором HYNIC, оказало заметное влияние на захват печенью вариантов, меченных ^{99m}Tc, конъюгированных с HYNIC на С-конце. В эксперименте, где изучался DARPin G3 с пептидными хелаторами, такого эффекта не наблюдалось. Биораспределение комплексов DARPin G3 с пептидными хелаторами было полностью сопоставимым как в случаях, когда формуляция была приготовлена с использованием немеченных белков с пептидными хелаторами, так и в случаях, когда использовали для формуляции белок с $(HE)_3$-тагом. Наблюдаемый эффект может быть полезен для улучшения биораспределения HYNIC-модифицированного DARPin G3, но для подтверждения этой гипотезы требуются дальнейшие исследования. Однако для клинического перевода было бы сложно готовить смесь разных модификаций белка в одном флаконе.

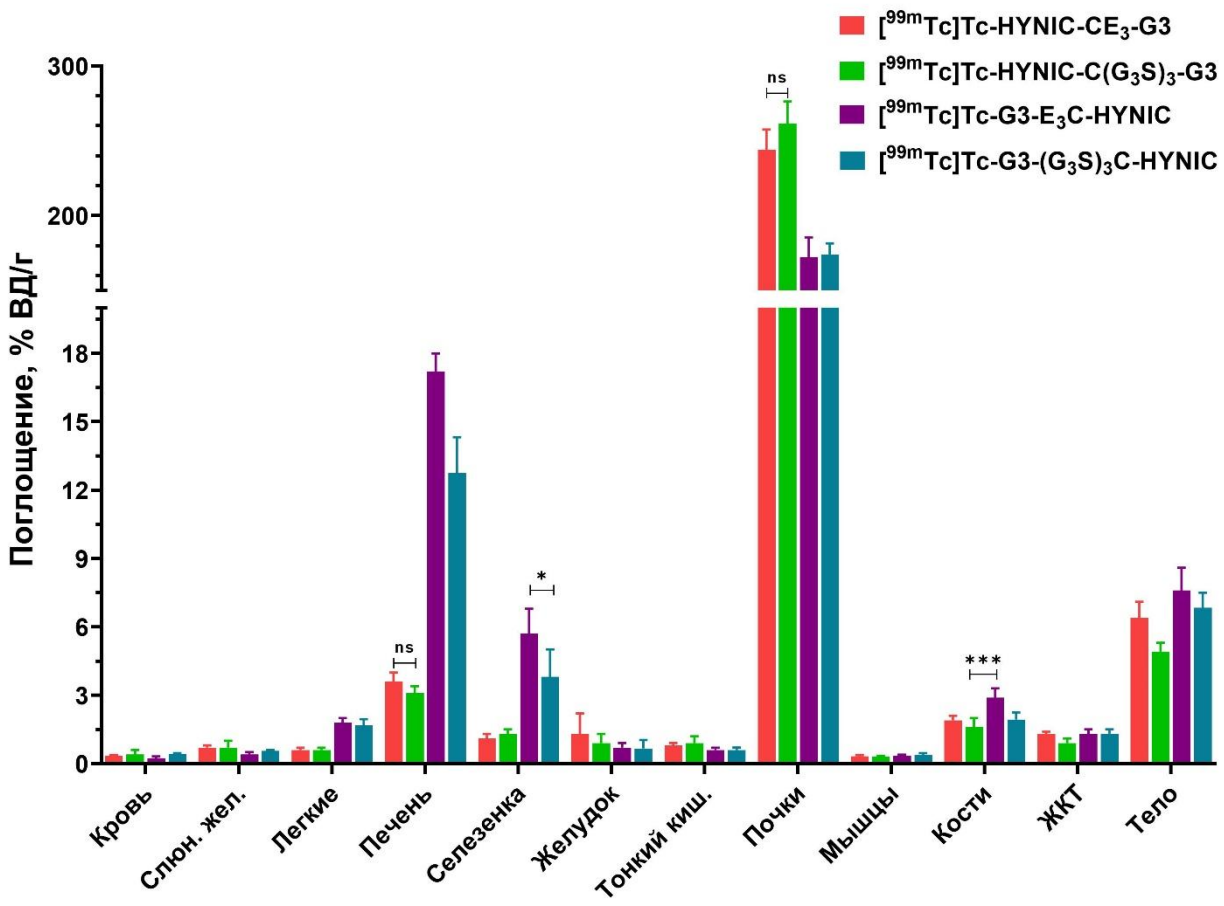


Рисунок 36 – Сравнительное биораспределение вариантов G3-HYNIC, меченных ^{99m}Tc, через 4 ч после инъекции у мышей стока CD1. Данные представлены как среднее значение %ВД/г ± S. Данные для желудочно-кишечного тракта с содержимым и для остального тела представлены как %ВД на весь образец. Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ)

Сравнение биораспределения [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3, [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC у иммунодефицитных мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 представлено на рисунке 37 (Приложение Г. таблица Г2). Поглощение [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 в печени и селезенке было статистически значимо ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ) ниже, чем поглощение [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC. Вариант [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 показал более высокое удержание активности в крови. Распределение активности, характеризовалось низкими уровнями

накопления в слюнных железах и желудке для всех вариантов G3-HYNIC у мышей с ксенотрансплантатом SKOV-3 и было схожим с распределением полученном на здоровых 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. В то время как поглощение в печени для [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 у мышей Nu/j существенно увеличилось по сравнению с мышами стока CD1, 12,2 ± 1,4 %ВД/г против 3,6 ± 0,4 %ВД/г соответственно. Это расхождение можно объяснить биохимическими и метаболическими различиями между линиями мышей CD1 и Nu/j.

Кроме того, характер удержания в почках у мышей Nu/j изменился по сравнению с мышами CD1. Не было статистически значимой разницы в накоплении в почках 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.

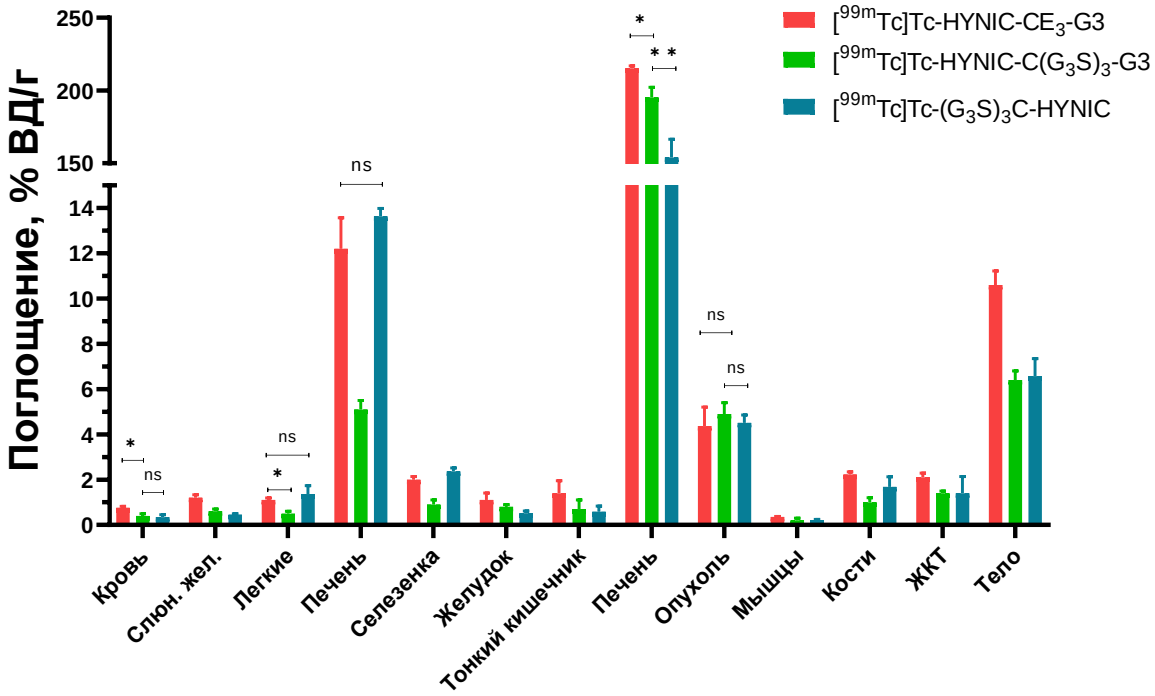


Рисунок 37 – Сравнительное биораспределение [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3, [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC через 4 ч после инъекции у мышей линии Nu/j с экспрессирующими HER2ксенотрансплантатами SKOV-3. Данные представлены как среднее значение % ВД/г ± S для четырех мышей. Данные для остальной части желудочно-кишечного тракта с содержимым и для остального тела представлены как %ВД на весь образец. Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ)

Таргетные свойства в HER2-экспрессирующих опухолях для [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 были подтверждены *in vivo* на мышах Nu/j. Поглощение в HER2-отрицательных ксенотрансплантатах Ramos было существенно ($p < 0,05$, t-тест) ниже, чем в HER2-положительных ксенотрансплантатах SKOV-3 (рисунок 38). Это подтверждает, что уровни поглощения коррелируют с уровнями экспрессии HER2 для обоих вариантов.

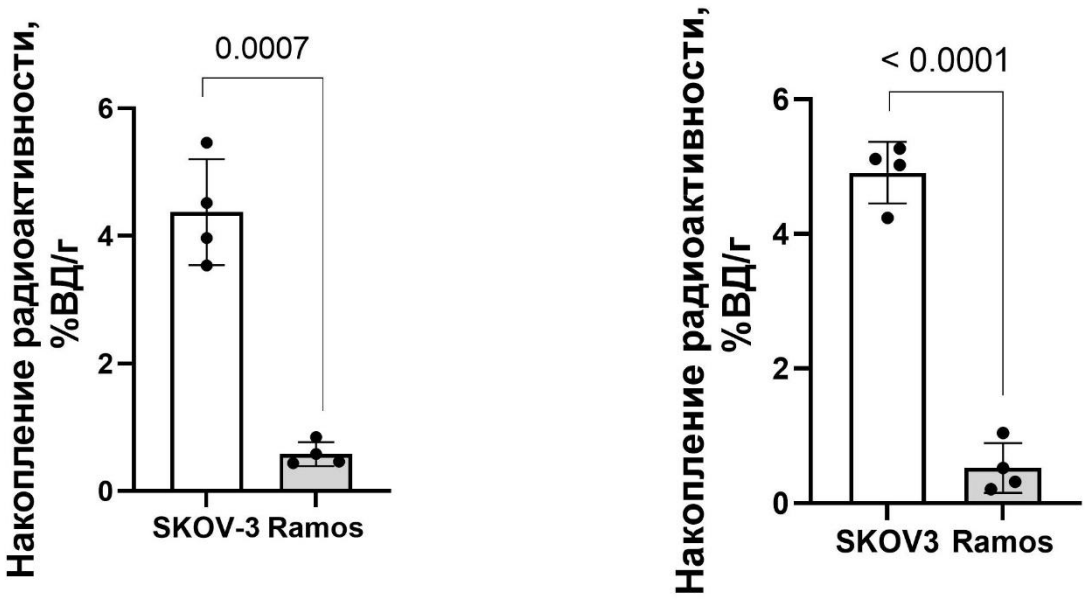


Рисунок 38 – Специфическое накопление в HER2-экспрессирующих опухолях вариантов [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 (рисунок слева) и [^{99}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 (рисунок справа) *in vivo*. Опухолевое поглощение у мышей линии Nu/j с HER2-положительными ксенотрансплантатами SKOV-3 сравнивали с поглощением у мышей с HER2-отрицательными ксенотрансплантатами Ramos для каждого варианта. Данные представлены как среднее значение %ВД/г ± S для четырех мышей

Соотношение опухоль/орган для [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3, [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC через 4 ч после инъекции у мышей Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 представлены на рисунке 39 (Приложение Г. таблица Г3). При прямом сравнении [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC обеспечил статистически значимо ($p < 0,05$, ANOVA) более высокое соотношение опухоль/орган (опухоль/кровь = 2,4:1, опухоль/слюнные железы = 2,78:1, опухоль/желудок = 2,25:1) по сравнению с вариантами [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-E_3C-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.

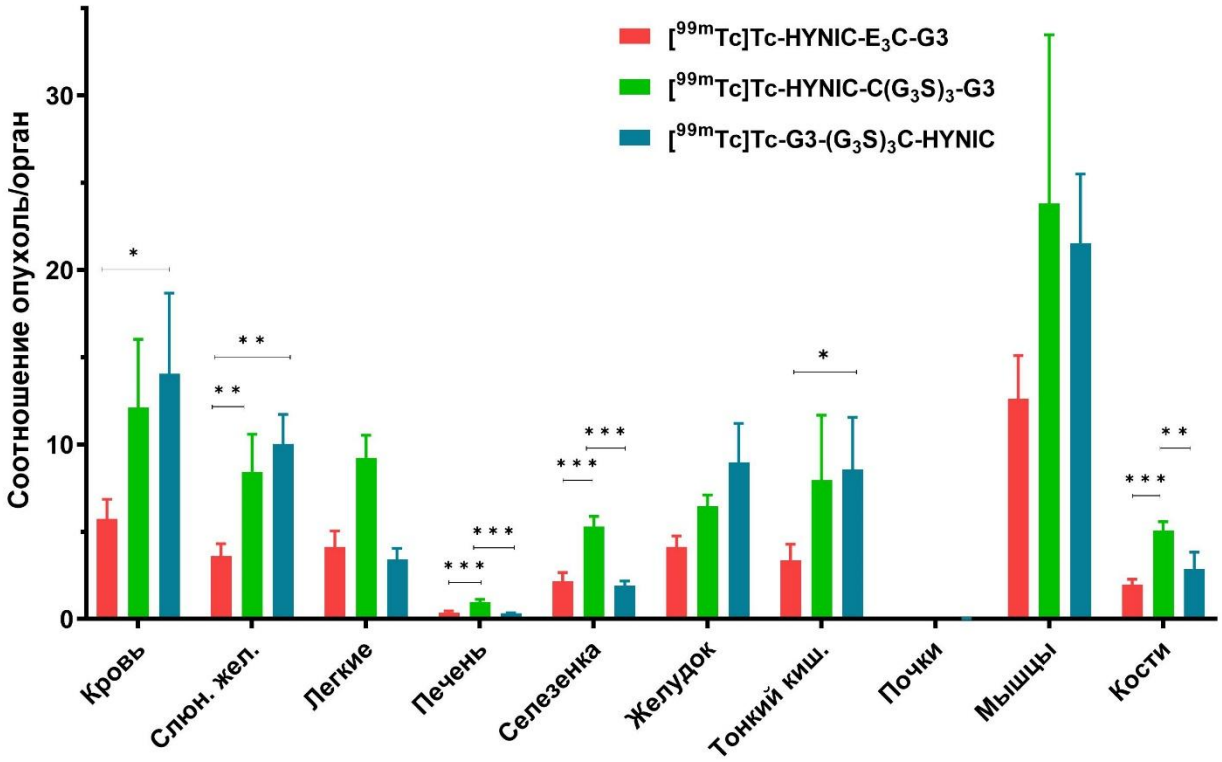


Рисунок 39 – Соотношения опухоль/орган для [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE$_3$-G3, [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G$_3$S)$_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C-HYNIC через 4 ч после инъекции у мышей линии Nu/j с экспрессирующими HER2ксенотрансплантатами SKOV-3. Данные представлены как среднее значение %ВД/г ± S для четырех мышей. Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ)

Результаты визуализации (рисунок 40) у мышей с ксенотрансплантатами SKOV-3 и Ramos через 4 ч после инъекции подтвердили данные *ex vivo* распределения. У [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G$_3$S)$_3$-G3 наблюдалось заметно меньшее накопление активности в органах брюшной полости и большее накопление в опухоли по сравнению с [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE$_3$-G3. Накопление активности в экспрессирующих HER2 ксенотрансплантатах SKOV-3 было существенно выше, чем в ксенотрансплантатах Ramos без экспрессии HER2, что подтверждает таргетные свойства обоих ^{99m}Tc-меченых вариантов DARPin G3-HYNIC *in vivo*.

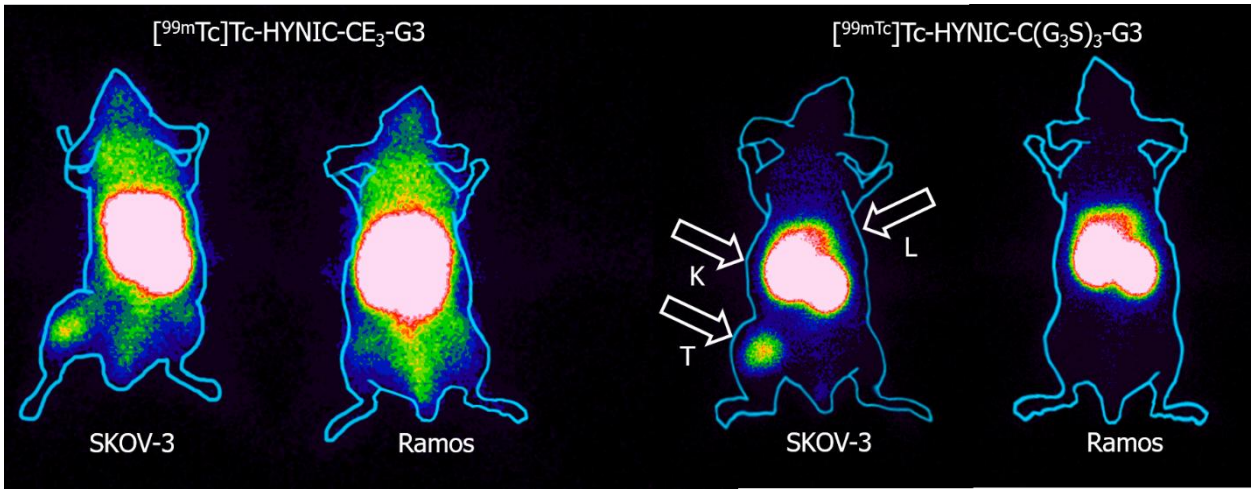


Рисунок 40 – Визуализация экспрессии HER2 методом гамма-камеры у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и Ramos через 4 ч после инъекции вариантов [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE$_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G$_3$S)$_3$-G3 L – печень, K – почки, T – опухоль

Таким образом для высокочувствительной визуализации крайне важно обеспечить высокий контраст, который определяется как высоким захватом в опухолевой ткани, так и низким в нормальных органах. Комплекс [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G$_3$S)$_3$-G3 показал достоверно более низкий захват в печени и селезенке ($p < 0,05$) по сравнению с другими вариантами DARPin G3-HYNIC (рисунок 38). Как следствие, это обеспечивает улучшенную контрастность визуализации этих тканей (рисунок 39). Ранее сообщалось, что использование тримерных линкеров, таких как (G$_3$S)$_3$, может обеспечить более правильное сворачивание доменов [156] и снизить захват в печени по сравнению с одиночным линкером [157]. В исследовании DARPin G3, меченных технецием-99м с пептидными хелаторами G$_3$C и (G$_3$S)$_3$C, не наблюдалось статистически значимой разницы в отношении опухоль/печень (0,28 ± 0,06 против 0,45 ± 0,09 %ВД/г) и в отношении других органов брюшной полости, куда часто метастазирует HER2-экспрессирующий рак.

Очевидно, что изменения в положении хелатора в DARPin G3-HYNIC привели к различиям в фармакокинетических характеристиках.

ГЛАВА 4 ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА РФЛП «DARPIN G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc»

Особенность выбора таргетной молекулы для клинической визуализации состоит не только в высокой аффинности к мишени, но и в оптимальном сочетании фармакокинетических параметров, технической воспроизводимости мечения, а также переносимости доклинических данных на человека. К сожалению, в нашей работе химия образования HYNIC-ядра не оправдала наши ожидания, комплексы [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-HYNIC имеют ряд недостатков: необходимость очистки методом гель-эксклюзионной хроматографии, повышенное накопление в слюнных железах, легких, селезенке, мышцах, костях, высокое накопление в почках и печени и не могут быть рекомендованы к проведению клинических исследований.

В нашем исследовании было показано, что цистеинсодержащие пептидные хелаторы DARPin G3, включая вариант G3-$(G_3S)_3C$, обеспечивают высокий радиохимический выход (более 98 %) и стабильность комплекса, обеспечивают 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 $(HE)_3$-G3 в стандартных доклинических исследованиях действительно демонстрировал лучшее соотношение опухоль/орган для печени, легких и других тканей по сравнению с исследуемыми нами новых вариантов DARPin G3. Однако эти преимущества при интерпретации требуют осторожности, поскольку видо- специфичные особенности почечной реабсорбции и эндоцитоза у мышей (в частности, опосредованные рецепторами мегалин/кубилин) приводят к высокой почечной активности, плохо коррелирующей с ожидаемыми параметрами у человека [158, 159].

В совокупности эти факторы обосновывают выбор DARPin G3-$(G_3S)_3C$ для рекомендации его к проведению клинических исследований и фармацевтической разработки РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc»: он сочетает сопоставимую с

DARPin $(HE)_3$-G3 способность таргетного накопления в опухолевых тканях и технологические преимущества изготовления, при этом потенциальные различия в биораспределении, выявленные в мышиных моделях, не представляются непреодолимым препятствием для клинической трансляции. Для минимизации рисков предусматриваются этапы ранней дозиметрии, подбор оптимальной дозы белка и моделирование фармакокинетики с учетом видоспецифичных параметров, что также согласуется с международной практикой трансляции радиомеченых каркасных белков [20].

Разрабатываемый в данной работе РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» будет представлять собой готовый препарат, получаемый в процессе мечения при смешивании химического и радионуклидного предшественников. В соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и с учетом особенностей, установленных законодательством о радиационной безопасности, такое изготовление допускается непосредственно в отделениях медицинской организации (приказ Минздрава №1218н от 12.11.2020) либо в производственной аптеке (в том числе в форме структурного подразделения медорганизации, как это предусмотрено приказом Минздрава России от 31.07.2020 № 780н). В случае производственной аптеки организация должна располагать лицензией на фармацевтическую деятельность, включающей работы по изготовлению радиофармацевтических лекарственных препаратов для медицинского применения (постановление Правительства РФ от 31.03.2022 № 547), а также лицензией Роспотребнадзора на деятельность в области использования генерирующих источников ионизирующего излучения (постановление Правительства РФ от 25.01.2022 № 45).

Процесс изготовления РФЛП в медицинской организации регламентируется Порядком изготовления радиофармацевтических препаратов непосредственно в медицинских организациях, утвержденным приказом Минздрава России от 12.11.2020 № 1218н. Кроме того, при изготовлении и обращении препарата должны соблюдаться требования ГОСТ Р 57298-2024

«Радиофармацевтические лекарственные препараты», «Общие правила производства и изготовления», а также нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009) и основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ-99/2010), а также правила Государственной фармакопеи РФ.

В соответствии с требованиями ОФС «Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов» химический предшественник должен входить в набор для приготовления РФЛП, который также может содержать вспомогательные вещества. Поэтому в данной работе первоначально необходимо было разработать 1) состав набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», 2) способ получения набора в форме стерильного лиофилизата и 3) методику мечения набора радионуклидным предшественником (собственно способ изготовления готового РФЛП).

Поскольку состав, технологические операции получения лиофилизата, условия мечения могут непосредственно влиять на функциональную пригодность готового РФЛП, важным этапом работы было проверить функциональную пригодность *in vitro* и *in vivo* готового препарата, полученного по разработанному составу и способу изготовления. Подтверждение сохранения функциональной пригодности готового препарата особенно значимо в случае, когда в качестве химического предшественника используются вещества белковой/пептидной природы, аффинные к молекулярным мишеням.

Кроме того, в ГФ XV появляются ФС на отдельные химические предшественники и в будущем ожидаются ФС на наборы для приготовления РФЛП, поэтому является необходимым разработка методик контроля качества химического предшественника в наборе для НД.

Разработка и валидация методик контроля качества готового препарата – также необходимый этап в фармацевтической разработке, который позволяет проводить процедуру контроля качества готового РФЛП в медицинской организации**,** включающей оценку показателей качества: описание, активность

или объемная активность, водородный показатель (pH), радиохимическая чистота, стерильность, маркировка, в соответствии с приказом Минздрава РФ N 1218н от 12 ноября 2020 г.

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

Исходный химический предшественник – очищенный белок DARPin G3-$(G_3S)_3C$ производится лабораторией молекулярной иммунологии ИБХ СО РАН в виде раствора с концентрациями от 5 – 10 мг/мл в буфере для хранения при температуре 4-8 °C. Сотрудниками лаборатории определяются необходимые показатели контроля качества каждой серии белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$ согласно разработанной ими нормативной документации по контролю качества в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Получение радиокомплекса [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ для *in vitro* и *in vivo* изначально проводилось так называемым «мокрым» мечением, т.е. все реактивы использовали в виде растворов, приготовленных непосредственно перед применением. Такой способ мечения применим в начальных исследовательских целях, но является неудобным для дальнейшего применения в медицинской организации.

Поэтому 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.

Одним из ключевых требований при введении радиоактивной метки в состав молекулы-предшественника является обеспечение высокой устойчивости образующейся химической связи между радионуклидом и исходным

соединением. На практике достижение стабильного комплекса нередко требует включения в реакционную систему вспомогательных веществ, способствующих поддержанию необходимого валентного состояния реагирующих компонентов и предотвращающих побочные реакции.

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. В рамках настоящей работы в качестве дополнительного вспомогательного реагента был выбран глюконат натрия**,** выполняющий функцию солиганда в процессе восстановления ^{99m}Tc. Его присутствие в реакционной среде препятствует гидролизу ионов олова(II) и образованию нерастворимого оксида олова(IV) SnO_2, что способствует более контролируемому восстановлению пертехнетат-ионов [160].

Кроме того, был добавлен ЭДТА для связывания примесей катионов металлов, негативно влияющих на образование радиокомплексов.

Исследовали три состава метящей смеси с различным содержанием вспомогательных веществ (таблица 12) с последующим проведением контроля качества полученного радиокомплекса.

Таблица 12 – Состав вспомогательных веществ метящей смеси в 0,01 М PBS (pH 7,4) из расчета на 100 мкл

	Состав 1, мг	Состав 2, мг	Состав 3, мг
ЭДТА	0,05	0,1	0,15
Олова (II) дихлорид	0,035	0,075	0,09
Глюконат натрия	2,5	5	7,5

Стабильный высокий (более 98 %) радиохимический выход комплекса [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ был достигнут при использовании состава 2.

На втором этапе дополнительно в состав реакционной системы был введен D-маннит, выполняющий функции крио- и лиопротектора. Его применение направлено на защиту белковой молекулы от структурных изменений и агрегации на этапах замораживания и лиофилизации, а также на формирование механически устойчивой лиофилизированной матрицы, обеспечивающей воспроизводимость восстановления препарата.

Экспериментальные исследования по оптимизации состава вспомогательных веществ проводили по следующему протоколу. К составу 2 метящей смеси добавляли 0,33, 0,66 и 0,99 мг D-маннита из расчета на 100 мкл раствора. Далее в реакционный флакон объемом 1,5 мл, добавляли 3,3 мг восстановленного DARPin G3-$(G_3S)_3C$. Полученный раствор замораживали при –80°С в течение 4 ч и лиофилизировали при температуре –60°С и давлении 0,05 торр в течение 12 ч. После завершения лиофильной сушки к полученному лиофилизату добавляли 1 мл пертехнетата натрия ^{99m}Tc (с активностью 500-1000 МБк). Реакционную смесь перемешивали и инкубировали при 60 °С в течение 30 мин. Промежуточную оценку степени восстановления технеция и образования меченного комплекса осуществляли через 15 и 30 минут после начала реакции. Максимальный радиохимический выход составил 75 % через 15 мин и 85 % через 30 мин для содержания D-маннита 0,66-0,99 мг из расчета на 100 мкл раствора вспомогательных веществ.

Помимо D-маннита, были проведены испытания по аналогичной методике с использованием D-маннозы, сахарозы, лактозы и трегалозы. После растворения лиофилизатов, содержащих D-маннозу или сахарозу, наблюдалось пожелтение растворов и снижение РХВ. Наибольшие РХВ были достигнуты при применении D-маннита и трегалозы.

В качестве вспомогательной стабилизирующей добавки использовали полиэтиленгликоль-4000 (ПЭГ-4000), который не является классическим лиопротектором, однако оказывает существенное влияние на свойства лиофилизированной системы. ПЭГ-4000 способствует снижению поверхностной адсорбции и агрегации белка, модифицирует структуру лиофилизированной

матрицы и улучшает равномерность распределения компонентов, что в совокупности повышает стабильность химического предшественника и воспроизводимость процесса приготовления радиофармацевтического препарата. Было проведено три серии экспериментов с добавлением 0,15, 0,3, 0,45 мг ПЭГ-4000 из расчета на 100 мкл раствора вспомогательных веществ. При содержании ПЭГ-4000 0,3-0,45 мг в 100 мкл раствора вспомогательных веществ радиохимический выход составил более 95 %. Для проверки гипотезы комбинированного влияния D-маннита и ПЭГ-4000 на стабилизацию молекулы DARPin G3-$(G_3S)_3C$ при лиофилизации, были проведены дополнительные исследования состава 2 метящей смеси с добавлением 0,3 мг ПЭГ-4000 без добавления D-маннита. Радиохимический выход [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ составил 5 %. УФ-спектрофотометрическое определение концентрации белка при 280 нм выявило резкое снижение его содержания в растворе, приготовленном из лиофилизата. Электрофорез в ПААГ подтвердил отсутствие полосы, соответствующей DARPin G3-$(G_3S)_3C$. Низкий РХВ объясняется тем, что белок, лиофилизированный в отсутствие D-маннита, впоследствии не растворяется.

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 был достигнут при следующем составе вспомогательных веществ в 0,01 М PBS (pH 7,4) из расчета на 100 мкл: 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 составляло 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°С в течение 30 мин), оптимизированные в разделе 3.2. Для получения готового

стерильного РФЛП было подобрано оптимальное количество раствора пертехнетата натрия, необходимое для получения препарата с активностью ^{99m}Tc, достаточной для радионуклидной диагностики пациента, с учетом потерь в процессе обязательной стерилизующей фильтрации.

Экспериментальным путем на серии лиофилизатов было установлено, что после получения готового препарата, изолированный выход активности после стерилизующей фильтрации с помощью фильтра с незаряженной (нейтральной) мембраной из полиэфирсульфона (PES) **(**0,22 мкм) составил 94±2%. С учетом установленного изолированного выхода и распада активности в процессе изготовления препарата, предложено использовать радинуклидный предшественник – элюат натрия пертехнетата с активностью ^{99m}Tc в количестве 500-700 МБк.

Установленный изолированный выход активности является также изолированным выходом и для белка DARPin G3-$(G_3S)_3$C. Поэтому предложено вводить в лиофилизат навеску белка (3,3 мг) с поправкой на изолированный выход.

В этих условиях радиохимический выход комплекса [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3$C составил 98 ± 2 % и не требовалась хроматографическая очистка. Также была подтверждена стабильность радиокомплекса в течение 6 ч.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применяемый состав набора для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3$C, ^{99m}Tc» формирует достаточно стабильные комплексы с технецием, восстановленным ионами Sn(II) до четырех- и пятивалентного состояния, что делает его применимым для фармацевтической разработки.

Проведение испытаний стабильности в процессе хранения проводили в соответствии с ОФС.1.11.0001 «Радиофармацевтические лекарственные препараты» по показателям качества для радиофармацевтических лекарственных препаратов, изготовленных с использованием радионуклидных генераторов или растворов радионуклидов и наборов реагентов в медицинских учреждениях.

Определен срок хранения наборов 2 года при температуре – 20 °С (испытания еще продолжаются).

Результаты исследований по подбору состава и получения лиофилизата легли в основу более подробной технологической разработки, которая не являлась задачей данной диссертационной работы и проводилась в рамках программы Приоритет-2030-НИП/ИЗ-003-0000-2022 «Создание радионуклидных агентов для молекулярной диагностики онкомаркера HER2 в злокачественных новообразованиях» нашей командой в НИЦ «Онкотераностика», были разработаны подробные технологии производства, лабораторные регламенты на набор для приготовления разрабатываемого РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» и осуществлялась наработка серий опытных образцов для проведения клинических исследований на базе ФГАОУ ВО «НИ ТПУ».

4.2 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. На функциональную пригодность таргетной молекулы белковой природы влияют многие факторы, в частности выбор хелатирующего агента для связывания радионуклида ^{99m}Tc, условия мечения, состав композиции (комбинация химических предшественников). Существенную роль на аффинность, таргетные свойства и биораспределение in vivo таких молекул оказывает вид лекарственной формы. 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.

Следует отметить, что таргетные белки, содержащие аминокислоту цистеин, легко окисляются до не аффинных гомодимеров, что делает их очень чувствительными к технологическим режимам, которые используются в получении лиофилизатов, являющихся, несомненно, наиболее удобными и стабильными при хранении лекарственными формами для рутинного изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов в медицинской организации [20].

После добавления элюата пертехнетата натрия, полученного с генератора, к лиофилизату, реакционную смесь инкубировали при нагревании в соответствии с ранее описанной методикой. При этом радиохимическая чистота 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 радиохимической чистоты без необходимости дополнительной стадии очистки.

Для изучения специфичности к HER2 меченого ^{99m}Tc лиофилизата белка G3-$(G_3S)_3C$ использовали клеточные линии с различным уровнем экспрессии рецептора: SKOV-3 (карцинома яичников человека) > BT-474 (карцинома молочной железы человека) > DU-145 (аденокарцинома простаты человека). Эксперимент проводили с блокированием рецепторов немеченым белком G3-$(G_3S)_3C$. Изучение специфичности *in vitro* продемонстрировало, высокий уровень специфического связывания с клетками и пропорционально уровню экспрессии HER2 в клетках. При этом блокирование рецепторов избытком немеченого белка отмечается значительное снижение связывания [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ во всех группах клеток ($p < 0{,}0005$) (Рис. 1).

Оценка аффинности методом насыщения показала, что [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ связывается с рецепторами HER2 на поверхности клеток SKOV-3 с наномолярным значением K_D (3,9±0,5 нМ) (рисунок 41), что характеризует меченый ^{99m}Tc белок, полученный из лиофилизата, как высокоаффинный к целевым рецепторам.

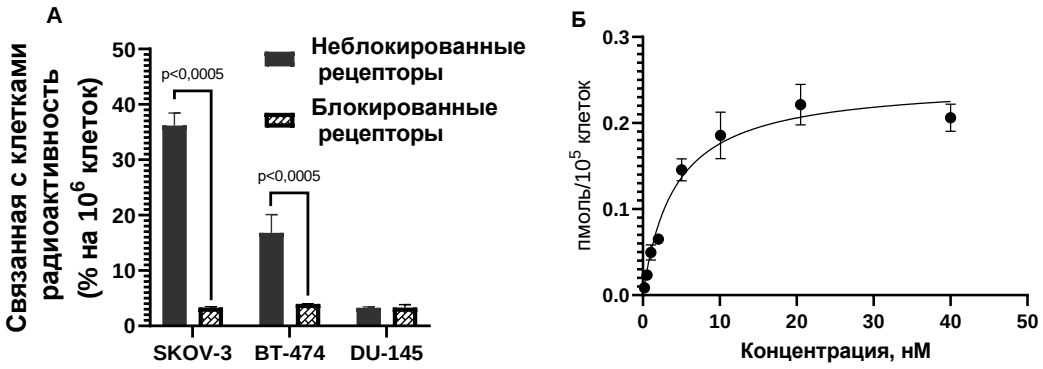


Рисунок. 41 – Результаты *in vitro* оценки меченого ^{99m}Tc лиофилизата белка G3-$(G_3S)_3C$. А – Определение специфичности связывания с HER2. Б – Кривая насыщения показана на HER2-экспрессирующих клетках SKOV-3. Результаты представлены в качестве средних значений % на 10^6 клеток ± S из трех образцов

Сравнение биораспределения и накопления [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ в ксенотрансплантатах SKOV-3 с высокой экспрессией HER2 и Ramos с отсутствием экспрессии HER2 представлены на рисунке 42. Параллельное сравнение биораспределения [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ в ксенотрансплантатах SKOV-3 и Ramos показало, что характер биораспределения аналогичен ($p > 0,05$), за исключением накопления в опухоли. Поглощение [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ в ксенотрансплантатах SKOV-3 было значительно ($p < 0,005$) выше, чем в ксенотрансплантатах Ramos. Это показывает, что уровень накопления коррелирует с экспрессией HER2.

[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ продемонстрировал быстрое выведение из крови и преимущественно почечный клиренс, при этом наблюдалось невысокое сохранение активности в почках 12-20 %ВД/г. Это может быть обусловлено быстрой интернализацией белка после реабсорбции в почках и высвобождения из клетки радиометаболитов, содержащих остатки аминокислоты глицина в хелатной группе [161].

Низкие уровни накопления активности отмечаются также в слюнных железах и желудке, что свидетельствует о стабильности радиокомплекса *in vivo*, поскольку не наблюдался гидролиз комплекса с выделением свободного ^{99m}Tc,

способного накапливаться в этих органах. Кроме того, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ имел очень низкое поглощение в легких, мышцах, тонком кишечнике и костях, что является благоприятным для визуализации метастаз в этих областях [149].

Уровень накопления активности в печени составил около 5-7 %ВД/г при соотношении опухоль/печень менее одного (около 0,7 раз), что является нежелательным для визуализации метастаз в печени. Однако, биораспределение у мышей не полностью совпадает с биораспределением у человека, и можно ожидать, что в клинических исследованиях уровень накопления в печени не будет препятствовать визуализации метастаз в печени [129, 158, 159]. Судя по всему, выделение радиометаболитов через желчь играло незначительную роль, так как активность в желудочно-кишечном тракте с его содержимым была низкой (около 2%). Можно предположить, что механизм удержания активности в печени не полностью обусловлен гепатобилиарной экскрецией, а возможно это лиганд-рецепторное взаимодействие или иные механизмы. Экспрессия HER2 в печени присутствует и может обуславливать накопление активности рецептор-зависимого белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в этом органе. Подбор оптимальной дозы белка в клинических исследованиях радиомеченых каркасных белков позволяет контролировать этот процесс и получать желаемый контраст для визуализации метастазов в печени [89, 162].

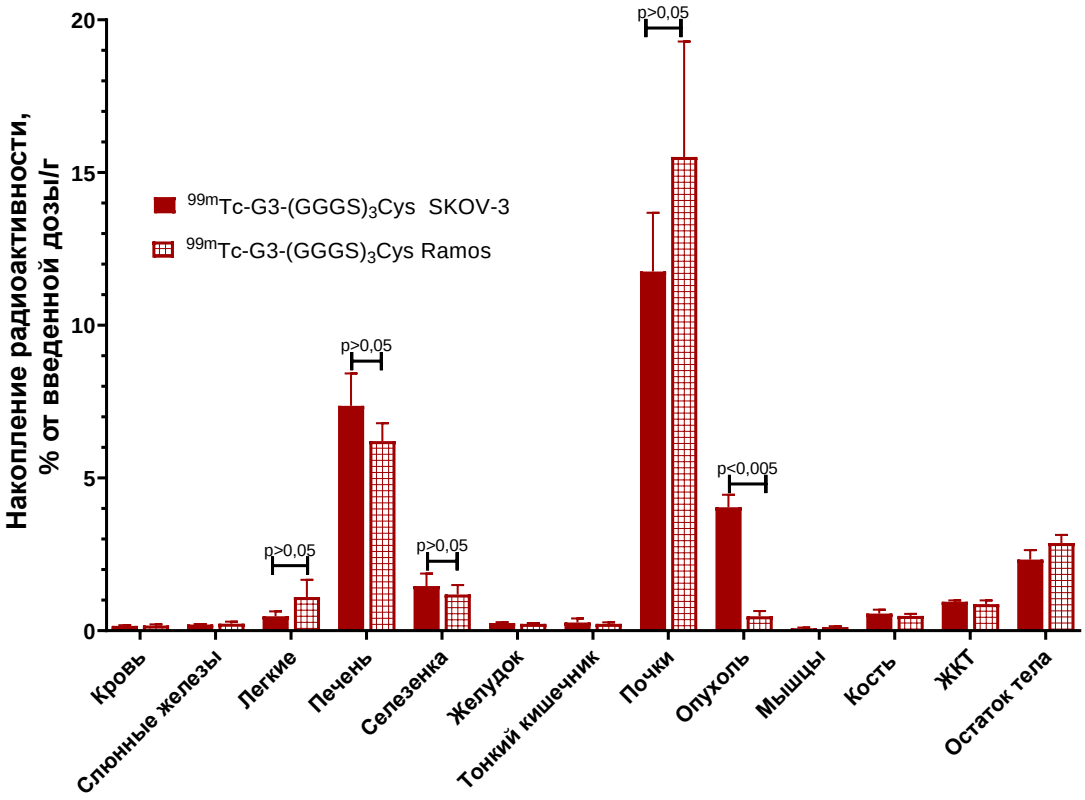


Рисунок 42 – Сравнительное биораспределение [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$, полученного из лиофилизата, через 4 ч после инъекции в ксенотрансплантатах SKOV-3 (высокая экспрессия HER2) и Ramos (отрицательная экспрессия HER2) у мышей Nu/j. Данные представлены в виде среднего значения %ВД/г ± S для пяти мышей (n=5). Данные для желудочно-кишечного тракта с его содержимым и остаток тела представлены в виде %ВД на весь образец

Сравнение данных по биораспределению и таргетным свойствам [^{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, как и нативный белок.

4.3 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 образцов. Каждый флакон набора для изготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» содержит 3,3 мг DARPin G3-$(G_3S)_3C$.

Требования к качеству химического предшественника изложены ОФС 1.11.0005 «Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов». Идентификация, испытание на химическую чистоту и количественный анализ являются обязательными показателями контроля качества.

Кроме того, химический предшественник DARPin G3-$(G_3S)_3C$ получается методом рекомбинантной ДНК. Согласно требованиям ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», для подтверждения подлинности могут применяться различные методы, включая электрофорез в полиакриламидном геле, капиллярный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, ионообменную или обращенно-фазную хроматографию, иммуноблоттинг и тандемную масс-спектрометрию, сопряженную с ВЭЖХ (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием стандартных образцов, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации. Дополнительно для оценки подлинности может быть использован метод определения специфической активности.

С учетом вышеизложенного, для химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в составе лиофилизата были предложены методики ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС, (определение показателей «Идентификация») УФ-

спектрофотометрия (для показателя «Количественное определение») и электрофорез в полиакриламидном геле (для определения показателя «Родственные примеси» и «Идентификация»), а также проведены необходимые испытания по оптимизации и валидации методик с учетом состава набора.

Хромато-масс-спектрометрический анализ DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в наборе

Анализ проводили в центре коллективного пользования ИБХ РАН СО РАН.

Подлинность G3-$(G_3S)_3C$ была подтверждена с использованием ВЭЖХ-МС (рисунок 43). Масс-спектр показал, что белок в основном присутствует в форме гомодимера (Mw = 28149,8 Да). Молекулярная масса мономера согласуется с расчетными и составила 14075,9 Да с точностью до 0,5 Да. Кроме того, анализ чистоты этим методом показал, что чистота белка была близка к 100%.

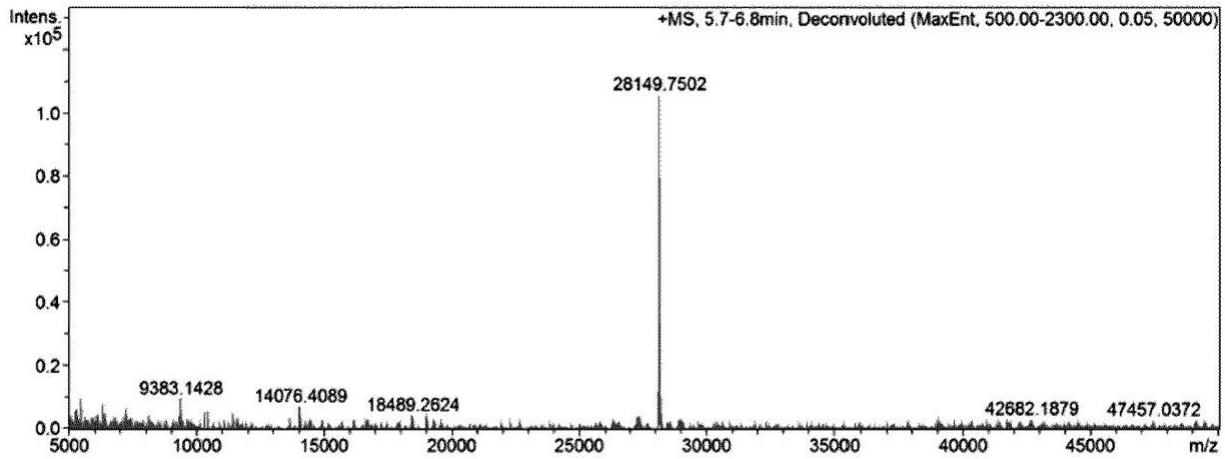


Рисунок 43 – Деконволюция масс-спектра DARPin G3-$(G_3S)_3C$

Идентификация DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в наборе методом электрофореза в ПААГ

Определение молекулярной массы белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$ проводили сравнением его относительной подвижности с подвижностью белков маркеров.

Для этого был построен график линейной регрессии логарифма относительных молекулярных масс (M_r) стандартов белков маркеров к фактору удерживания (R_f). Зависимость их R_f от логарифма молекулярной массы являлась линейной ($r > 0,95$). Молекулярную массу G3-$(G_3S)_3C$ вычисляли обратным логарифмированием (рисунок 44).

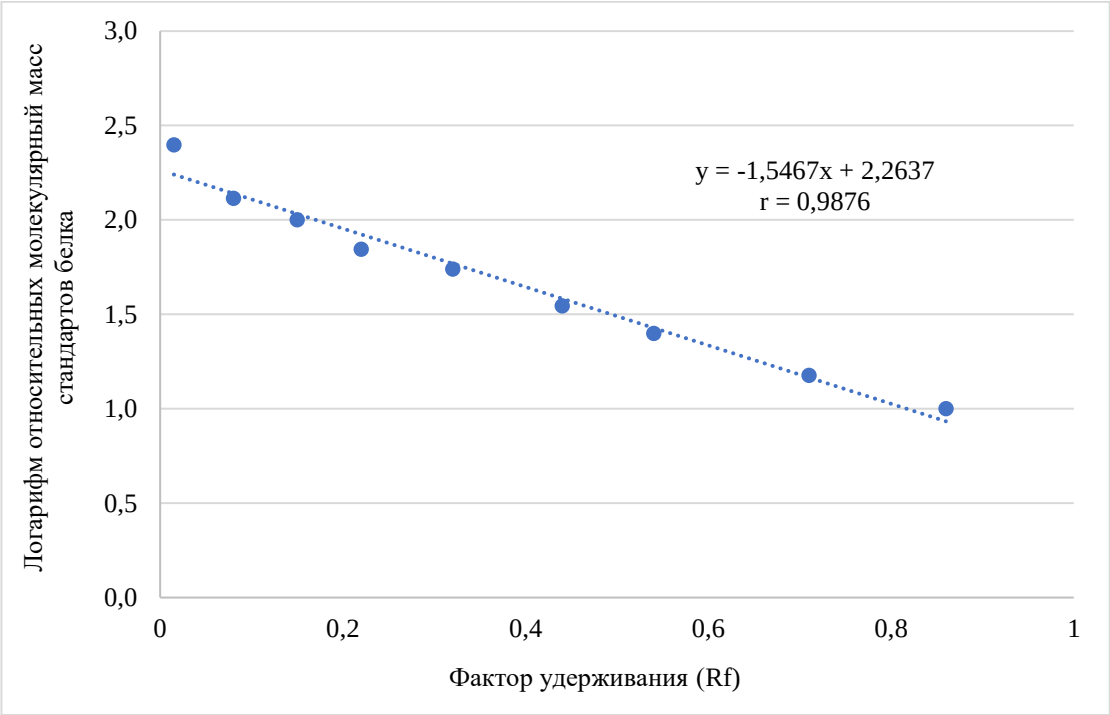


Рисунок 44 – График линейной регрессии относительных молекулярных масс (M_r) белка маркера от значений их факторов удерживания R_f

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%).

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.

Определение показателя «Родственные примеси» методом электрофореза в ПААГ

Белок DARPin G3-$(G_3S)_3$C в своей структуре содержит цистеин на С-конце, поэтому в процессе получения, хранения способен окисляться по тиольной группе цистеина и 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 как не более 5 %. Наличие других белковых примесей предложено контролировать с требованием к качеству как не более 2,5%.

ВЭЖХ-МС/МС для анализа первичной структуры

Анализ проводили в центре коллективного пользования ИБХ СО РАН.

Метод позволяет идентифицировать аминокислотную последовательность белка путем расщепления его до пептидных фрагментов с последующим разделением и идентификацией этих фрагментов в воспроизводимых условиях.

Перед проведением гидролиза пептидных связей в белке G3-$(G_3S)_3$C провели восстановление дисульфидных связей гомодимера с использованием восстановителя трис(2-карбонилэтил)фосфата (TCEP) с последующим метиламидированием свободного цистеина. Для ферментного расщепления белка до пептидных фрагментов были подобраны оптимальные воспроизводимые условия – инкубация при 85 °С в течение 16 ч в присутствии трипсина.

В результате анализа гидролизата белка было идентифицировано более 700 пептидных фрагментов, основные фрагменты с площадью пика более 10^6. Перекрытие аминокислотной последовательности целевого белка с идентифицированными пептидными фрагментами составило 100% (Приложение Д, рисунок Д3). Значение 10LogP составило более 20 (вероятность случайного совпадения идентифицированного пептида с базой данных составило менее 1%). Это позволяет идентифицировать индивидуальные пептиды с высокой степенью достоверности.

Содержание предполагаемых примесей других белков составило не более 2%. Соответственно чистота белка, установленная этим методом, составляет 98%.

Следовательно, методика ВЭЖХ-МС/МС для определения первичной структуры белка G3-$(G_3S)_3$C позволяет с высоким процентом перекрытия идентифицировать аминокислотную последовательность и также характеризует чистоту белка.

Валидация методики количественного определения методом спектрофотомерии

Методика количественного определения белка G3-$(G_3S)_3$C предложена в соответствии требованиями ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка» (метод 1) при длине волны 280 нм. Для расчета содержания белка G3-$(G_3S)_3$C в лиофилизате был выбран способ расчета через молярный показатель поглощения, поскольку белок имеет высокую степень очистки. Предлагаемое нами требование к содержанию белка G3-$(G_3S)_3$C в лиофилизате составляет ±10 % от номинального содержания.

Специфичность. Тирозин и фенилаланин в структуре G3-$(G_3S)_3$C обеспечивают избирательность анализа. Данный метод рекомендуется для включения в фармакопейную статью с целью количественного определения этого белка. При этом соли буфера и другие вспомогательные компоненты, входящие в состав лиофилизата, не имеют поглощения при этой длине волны и не влияют на результаты анализа.

Линейность. Линейность методики оценивали путем измерения шести стандартных растворов G3-$(G_3S)_3C$ в диапазоне концентраций от 80 % до 120 % (1,95; 1,8; 1,65; 1,5; 1,4 и 1,3 мг/мл). Каждый стандартный раствор анализировали в пяти повторах, после чего рассчитывали среднее значение оптической плотности для дальнейшей оценки линейной зависимости.

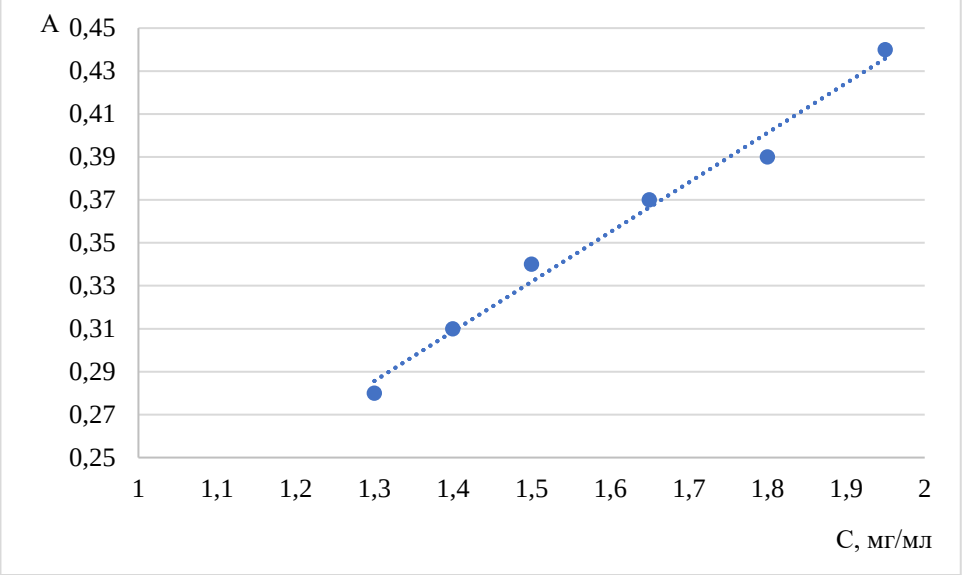


Рисунок 45 – График зависимости оптической плотности DARPin G3-$(G_3S)_3C$ от концентрации

Коэффициент корреляции равен 0,9923 при y= 0,2311*x - 0,0148, где y – оптическая плотность; x – концентрация (мг/мл), что свидетельствует о линейной зависимости оптической плотности G3-$(G_3S)_3C$ от концентрации G3-$(G_3S)_3C$ в растворе.

Сходимость и внутрилабораторная прецизионность. Сходимость определяли на основании результатов, полученных при анализе 9 образцов G3-$(G_3S)_3C$ одной серии одним аналитиком в один день. Результаты представлены в таблице 13. Для определения внутрилабораторной прецизионности проводили повторение эксперимента для определения сходимости другим аналитиком лаборатории. Результаты представлены в таблице 4.

Расчетное содержание G3-$(G_3S)_3C$ в лиофилизате составило 3,296 ± 0,032 мг.

Таблица 13 – 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	0,0249
Внутрилабораторная прецизионность	3,291	8	0,0265	0,0094	0,81	0,95	2,31	0,204

Примечание $\bar{x}$ – среднее значение, f – число степеней свободы, S – стандартное отклонение, $S_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение среднего результата, $RSD_{\bar{x}}$ – относительное стандартное отклонение среднего результата, выраженное в процентах (коэффициент вариации), *p* – уровень значимости, $t_{(p,f)}$ – критерий Стьюдента, $\Delta\bar{x}$ – полуширина доверительного интервала неопределенности среднего результата

Правильность методики оценивали методом добавок. Для этого использовали три модельных раствора с концентрациями 80 %, 100 % и 120 % от номинального значения (всего 9 измерений: по 5 для каждой концентрации). В качестве добавки применяли стандартный раствор G3-$(G_3S)_3C$ с концентрацией 3,3 мг/мл. Рассчитанные коэффициенты вариации не превышали 2 % в диапазоне концентраций 80 – 120 %, процент открываемости находился в пределах 98-102%, что подтверждает валидность методики по параметру правильность.

Таблица 14 – Результаты определения правильности методики

Номер модельного раствора	Введено белка, %	Найдено белка, $\bar{x}$, мг/мл	S	$S_{\bar{x}}$	$RSD_{\bar{x}}$, %	$\Delta\bar{x}$
1	80	2,633	0,025	0,0125	0,95	0,0311
2	100	3,287	0,02	0,01	0,61	0,0249
3	120	3,97	0,015	0,0075	0,38	0,0186

4.4 Оптимизация методики определения радиохимических примесей готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3$C, ^{99m}Tc»

Для определения радиохимических примесей был предложен метод радио-ТСХ, который является доступным и распространенным методом для стандартизации РФЛП по данному показателю, в том числе в условиях медицинского учреждения с применением типового оборудования для радиометрического анализа хроматограмм.

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 на стекловолокне, которые характеризуются высоким разрешением и экспрессностью анализа, а также возможностью примененять в качестве подвижных фаз буферные растворы.

Сразу после получения экспериментального образца препарата на линию старта полоски iTLC наносили 5 мкл раствора.

В качестве подвижной фазы для определения примеси А тестировали 0,01 М фосфатный буферный раствор с pH 7,4 (PBS) и ацетон. В подвижной фазе PBS

комплекс [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ и примесь B остаются на линии старта (R_f = 0,0-0,2), а свободные ионы [^{99m}Tc]TcO_4^- и солиганды [^{99m}Tc]Tc-ЭДТА, [^{99m}Tc]Tc-глюконат продвигаются с фронтом растворителя (R_f = 0,9-1,0). В подвижной фазе ацетон комплекс [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$, примесь B и солиганды [^{99m}Tc]Tc-ЭДТА, [^{99m}Tc]Tc-глюконат остаются на линии старта (R_f = 0,0-0,2), а свободные ионы [^{99m}Tc]TcO_4^- продвигаются с фронтом растворителя (R_f = 0,9-1,0). Для определения примеси B в качестве подвижной фазы использовали смесь пиридин : уксусная кислота : вода (10 : 3 : 1) в которой восстановленный гидролизованный технеций [^{99m}Tc]TcO_2 имеет R_f = 0,0-0,2, а свободные ионы [^{99m}Tc]TcO_4^-, [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ и меченые солиганды движутся с фронтом растворителя (R_f = 0,9-1,0). Для определения примеси B также в качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил : вода (2: 3) в которой восстановленный гидролизованный технеций [^{99m}Tc]TcO_2 имеет R_f = 0,0-0,2, а свободные ионы [^{99m}Tc]TcO_4^-, [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ и меченые солиганды движутся с фронтом растворителя (R_f = 0,9-1,0).

Распределение активности ^{99m}Tc на радиохроматограмме регистрировали радиометрическим методом с помощью установки «ГаммаСкан-01А» (Амплитуда, Россия). Была проведена внутрилабораторная сходимость другим аналитиком в другой день.

В качестве подвижной фазы для определения примеси A выбрали 0,01 М фосфатный буферный раствор с pH 7,4. Выбор обусловлен доступностью и безопасностью подвижной фазы, и возможностью оценивать совокупность примесей (свободные ионы [^{99m}Tc]TcO_4^- и солиганды [^{99m}Tc]Tc-ЭДТА, [^{99m}Tc]Tc-глюконат). В качестве подвижной фазы для определения примеси B выбрали ацетонитрил : вода (2: 3).

Немеченый химический предшественник DARPin G3-$(G_3S)_3C$ также был хроматографирован на iTLC полосках в предлагаемых подвижных фазах, в качестве детектирования использовали УФ-свет. В подвижной фазе 0,01 М фосфатного буфера на линии старта наблюдалось одно пятно (R_f = 0,0-0,2). В подвижной фазе ацетонитрил : вода (2: 3) на линии финиша (R_f = 0,9-1,0) также

наблюдалось одно пятно. Это подтверждает специфичность условий хроматографического анализа для определения радиохимических примесей. Так же была проведена внутрилабораторная сходимость.

4.5 Результат анализа стерильности и апирогенности

Определение содержания бактериальных эндотоксинов и стерильности проводили на базе лаборатории 31 НИИ ТПУ (отдел микробиологического контроля) в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» и ОФС «Стерильность» нескольких серий. Параметры определяли как для набора для изготовления готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», так и для готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc». Анализ БЭ выполняли с использованием ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл. Контрольный стандарт эндотоксина, применявшийся в исследовании, имел концентрацию 90 ЕЭ/флакон. Также была проведена проверка на наличие мешающих факторов – они были исключены.

Определенная в анализе концентрация БЭ в пяти сериях наборов для изготовления РФЛП составила не более 20 ЕЭ/мг (расчет на 1 мг белка). Повышенное содержание БЭ в лиофилизате обусловлено особенностью технологии получения белка методом рекомбинантной ДНК. С учетом этого в проект НД предлагается включить в требовании к качеству по этому показателю, подходящее для разрабатываемого набора, – (не более 30 ЕЭ/мг) (Приложение А).

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» (не более 175 МЕ/V, где V – максимальная доза препарата в мл). Образцы прошли испытания на

содержания БЭ. Протокол определения бактериальных эндотоксинов приведен в приложении Ж.

Посевы на тиогликолевой среде и среде Сабуро роста микроорганизмов не выявили. Все серии набора для изготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» и готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» были стерильны.

4.6 Результаты исследования острой токсичности

Объектом исследования являлся готовый РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», изготовленный из набора по разработанной методике изготовления, выдержанный до полного распада активности.

В эксперименте показано, что однократное внутривенное введение РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», в трех дозах, предусмотренных дизайном исследования, в течение 24 часов 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. Визуально не выявлено отличий в группах по потреблению воды и корма. Не обнаружено изменения тонуса мышц, увеличения или сужения зрачка, слезо- или слюноотделения, аномалий шерсти и кожных покровов, нарушений мочеиспускания и дефекации, общей локомоторной активности. Не отмечено изменений средней массы и процента прироста массы крыс в экспериментальных группах по сравнению с контролем. Данные температуры тела не различались в опытных и контрольных группах. Макроскопическое состояние внутренних органов животных, получавших радиофармпрепарат в различных дозах, не отличалось от состояния контрольных животных. Исследуемый препарат при внутрибрюшинном введении не вызывал раздражения брюшины. Масса органов и коэффициенты массы органов у крыс, получавших максимальную дозу исследуемого препарата, не отличались от

показателей контрольной группы как после внутривенного, так и после внутрибрюшинного введения.

Ввиду отсутствия гибели животных, определение $ЛД_{50}$ оказалось невозможным. Согласно ГОСТ 32644-2014, так как введение исследуемого вещества не вызвало гибели животных при введении в максимальной дозе, его следует отнести к 5 классу опасности с низким уровнем острой токсичности. Данные проведения острой токсичности представлены в приложении Е.

Таким образом, изученный РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», после его однократного внутривенного и внутрибрюшинного введения в трех дозах, в том числе, в максимально допустимой по объему дозе, через 24 часа и в течение 14 дней наблюдения не приводит к снижению массы и прироста массы тела, изменению температуры тела, не оказывает токсического влияния на исследованные органы и системы экспериментальных животных в выбранных условиях экспериментального исследования.

4.7 Разработка проекта фармакопейной статьи на таргетный РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc»

На основании экспериментальных исследований по фармацевтической разработке обоснованы основные показатели качества, которые были включены в проект НД на набор: описание, идентификация, количественное определение, определение примесей, бактериальные эндотоксины, стерильность, упаковка, маркировка, транспортирование, хранение, срок годности (Приложение А).

При разработке раздела НД о параметрах стандартизации готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» с учетом требований ОФС включены следующие основные показатели: состав, описание, pH, радиохимическая чистота, хранение, стерильность, бактериальные эндотоксины, срок годности. (Приложение А). Ко всем предлагаемым показателям качества предложены и обоснованы

требования. В проекте НД представлены разработанные и валидированные методики.

Результаты клинической апробации РФЛП [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C

В настоящее время в отделении радионуклидной диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ проводится I фаза клинического исследования РФЛП на основе меченных ^{99m}Tc рекомбинантных таргетных молекул DARPin G3-(G$_3$S)$_3$C для радионуклидной визуализации РМЖ с гиперэкспрессией HER2 (ClinicalTrials.gov ID: NCT05923268). Изготовление и контроль каждой серии экспериментального РФЛП в производственной аптеке НИИ онкологии проводится по разработанным и валидированным методикам, представленным в работе.

[^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C синтезировался провизором-технологом (Варвашеня Р.Н.) в асептических условиях непосредственно перед введением пациентам в условиях медицинской организации с обязательным анализом качества готового препарата. Кроме того, выборочные серии готового препарата оценивались на стерильность и наличие бактериальных эндотоксинов. Усредненная введенная пациентам доза препарата [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C составила (449,6±83,9) МБк.

В исследование было включено 10 больных РМЖ (T2-3 N0-2 M0) до начала проведения системного или хирургического лечения. В зависимости от статуса HER2 пациенты были разделены на две группы по 5 человек с гиперэкспрессией HER2 и без выраженной экспрессии данного маркера.

В ходе исследования не выявлено влияния [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C на физиологические показатели пациентов; после внутривенного введения препарата нежелательных явлений и побочных реакций не зарегистрировано.

Фармакокинетическое исследование показало отсутствие значимого связывания [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C с белками плазмы крови и быстрое выведение препарата из кровеносного русла. Период полувыведения из плазмы составил 2,5

ч (рисунок 46). Через 24 ч препарат практически полностью выводился из организма преимущественно почками с мочой.

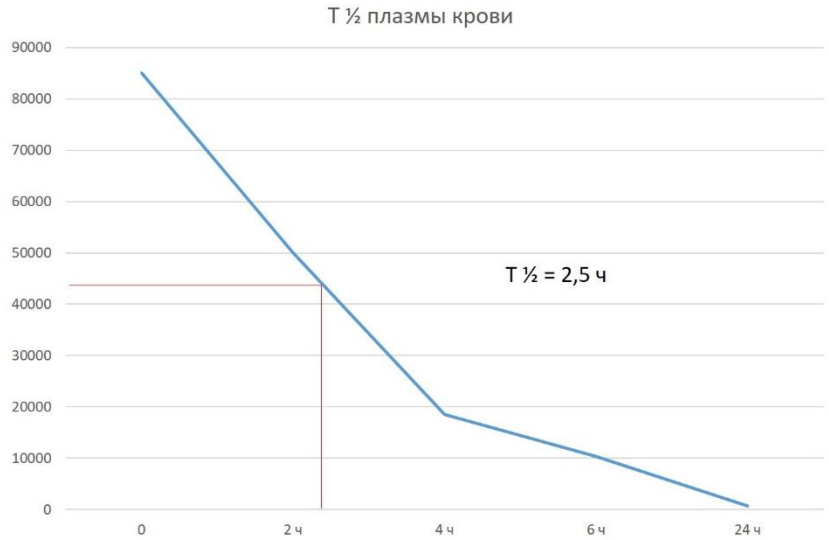


Рисунок 46 – Динамика выведения препарата [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C из плазмы крови пациентов. Результаты получены на основании радиометрии в проекции полостей сердца по данным планарного исследования в режиме Whole body

Основными органами накопления препарата являлись почки, что соответствовало преимущественно почечному пути его выведения.

Дозиметрические расчеты свидетельствуют о том, что критическими органами при применении препарата [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C в диагностических дозах следует считать почки ((0,1262±0,0369) мГр/МБк). Эффективная доза облучения при внутривенном введении препарата составляет около 5 мЗв для пациента со средней массой тела 70 кг (0,0137±0,0029 мЗв/МБк), что сопоставимо с эффективными дозами при большинстве диагностических радионуклидных исследований. Полученные дозиметрические характеристики свидетельствуют о возможности применения препарата в диагностических целях.

Пилотная оценка диагностической эффективности показала накопление [^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C в первичных опухолях и метастатически пораженных

лимфатических узлах. При количественной оценке накопления через 2 ч после введения среднее значение SUV в первичных опухолях у пациентов с HER2-положительным статусом составило 9,92 ± 2,30, тогда как в опухолях без выраженной экспрессии HER2 – 2,91 ± 1,50 ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о возможности использования [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ для визуализации опухолей с гиперэкспрессией HER2

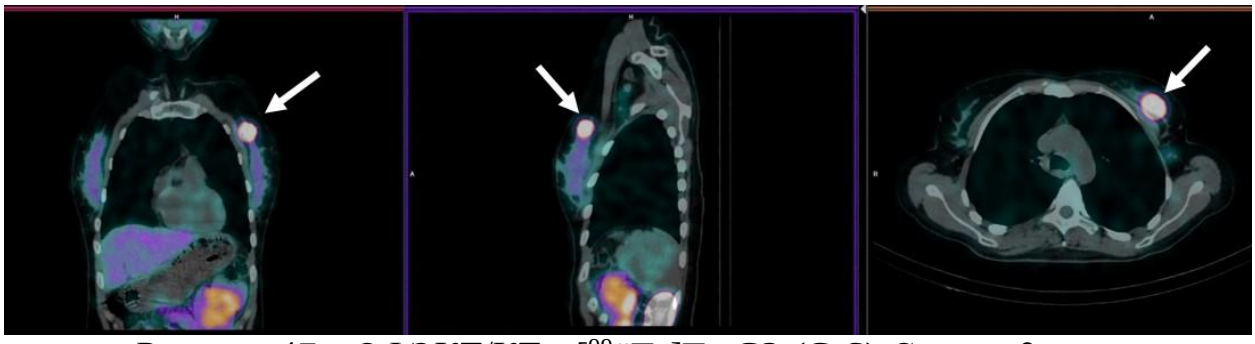


Рисунок 47 – ОФЭКТ/КТ с [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ через 2 часа после введения препарата. Визуализируется интенсивное накопление препарата в проекции опухоли левой молочной железы (T2N0M0, HER2 3+)

Таким образом, результаты I фазы клинического исследования подтверждают благоприятные показатели безопасности, фармакокинетики и дозиметрии [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$. Препарат характеризуется быстрым выведением из кровеносного русла, преимущественно почечным путем, приемлемой лучевой нагрузкой и накоплением в HER2-положительных опухолях, статистически значимо превышающим накопление в опухолях без выраженной экспрессии HER2. Полученные результаты подтверждают перспективность разработанного РФЛП для радионуклидной визуализации HER2-положительных опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецептор HER2 является ключевой молекулярной мишенью, прогностическим и предиктивным маркером, используемым при диагностике и таргетной терапии РМЖ. 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. Рекомбинантные белки на основе анкириновых повторов (DARPin) обладают наномолярным сродством к HER2 и пригодны для мечения различными радионуклидами.

Первый РФЛП для таргетной визуализации HER2 на основе каркасного белка [^{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 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, которые подтвердил безопасность и хорошую переносимость, обеспечивал надежную 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. Были разработаны и клинически оценены зарубежные каркасные белки – ADAPT6 и аффибоди. 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.

В представленной работе проведена разработка и сравнительное исследование радиокомплексов на основе каркасного белка DARPin G3, меченного технецием-99м, предназначенных для радионуклидной диагностики HER2-позитивных опухолей с целью выбора функционально пригодного образца для создания набора для приготовления РФЛП для простого одностадийного мечения в условиях отделений радионуклидной диагностики медицинских организаций. Выполненные экспериментальные исследования позволили полностью достичь цели.

Подобраны оптимальные условия радиомечения для серии вариантов DARPin G3 с пептидными хелаторами (G_3C, E_3C, $(G_3S)_3C$) и HYNIC-хелатором на N- и C-концах. Все исследованные варианты DARPin G3 с пептидными хелаторами продемонстрировали специфичность связывания с HER2-экспрессирующими клетками SKOV-3, насыщаемый характер взаимодействия и константу диссоциации в наномолярном диапазоне (1,9 – 5,0 нМ). Общей характеристикой пептидных вариантов явилась низкая скорость интернализации – до 25 % от общей связанной активности за 24 ч, при этом характер удержания активности различался в зависимости от аминокислотного состава хелатора. В экспериментах *in vivo* на моделях ксенотрансплантатов SKOV-3 и PC-3 варианты [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ обеспечивали визуализацию опухолей с различным уровнем экспрессии HER2, однако по совокупности характеристик немного уступали клинически апробированному [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 на мышиной модели. Вариант [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C был исключен из дальнейших испытаний вследствие неблагоприятного накопления в печени.

Переход к HYNIC-опосредованному мечению позволил существенно повлиять на биораспределение конъюгатов DARPin G3. Все HYNIC-модифицированные варианты сохраняли высокое сродство к HER2 ($K_D \approx 1,7$ нМ) и демонстрировали прогрессирующую интернализацию, достигавшую 44 – 48 %

через 24 ч. Замена пептидного хелатора на HYNIC сопровождалась кратным снижением накопления в печени и селезенке при одновременном повышении почечной экскреции и времени циркуляции в крови. Среди исследованных HYNIC-производных наилучшее соотношение «опухоль/фон» зарегистрировано для N-концевого конъюгата [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3, что обусловлено типом хелатора в сочетании с тримерным линкером $(G_3S)_3$, а также его положением.

Для варианта DARPin G3-$(G_3S)_3$C проведена фармацевтическая разработка лиофилизированного набора в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ, обоснован состав вспомогательных веществ, обеспечивающий сохранение функциональной активности белка, и предложен способ получения готового РФЛП.

Разработаны и валидированы методики контроля качества химического предшественника DARPin G3-$(G_3S)_3$C в наборе по показателям: описание, идентификация, количественное определение, определение примесей, бактериальные эндотоксины, стерильность, упаковка, маркировка, транспортирование, хранение, срок годности. Разработаны и валидированы методики контроля качества готового РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3$C, ^{99m}Tc» по показателям: состав, описание, pH, радиохимическая чистота, хранение, стерильность, бактериальные эндотоксины, срок годности. Установлены показатели качества, внесенные в проект фармакопейной статьи.

Проведенная фармацевтическая разработка и валидация методик контроля качества создало нормативную базу для дальнейшей клинической апробации препарата «DARPin G3-$(G_3S)_3$C, ^{99m}Tc».

В клиническом исследовании была проведена оценка фармакокинетических показателей, дозиметрии и функциональная пригодность к выявлению экспрессии HER2 у онкологических больных. По результатам проведенных исследований было показано, что препарат не оказывает токсического воздействия на организм человека, характеризуется быстрой элиминацией из кровяного русла, обеспечивает высокую контрастность

диагностического изображения, что позволяет достаточно эффективно выявлять очаги патологического накопления. Дозиметрические расчеты свидетельствуют о том, что критическими органами при применении препарата [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ являются почки ((0,1262±0,0369) мГр/МБк). Эффективная доза облучения при внутривенном введении препарата составляет около 5 мЗв, что сопоставимо с эффективными дозами при большинстве диагностических радионуклидных исследований.

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет рассматривать [^{99m}Tc]Tc-$(G_3S)_3C$-G3 как перспективный кандидат для неинвазивной визуализации HER2-позитивных злокачественных новообразований.

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, присоединенным 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 °C 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, нанесенный 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]Tc-ЭДТА и [^{99m}Tc]Tc-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-$(G_3S)_3$C, ^{99m}Tc».

7. Препарат «DARPin G3-$(G_3S)_3$C, ^{99m}Tc» не оказывает токсического воздействия на организм человека, характеризуется быстрой элиминацией из кровяного русла, обеспечивает высокую контрастность изображения опухоли, критическими органами при его применении являются почки, эффективная доза облучения при внутривенном введении РФЛП составляет около 5 мЗв.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, ТЕРМИНОВ

%ВД/г – процент введенной дозы на грамм

ABD – альбумин-связывающий домен

ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ

B_{max} – количество сайтов связывания на клетку

BSA – бычий сывороточный альбумин

DADS – диамидо-дитиолы

DADT – диамино-дитиолы

DTPA – диэтилентриаминпентауксусная кислота

FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США

FISH – флуоресцентная гибридизация in situ

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста второго типа

HYNIC – 6-гидразиноникотиновая кислота или производное 2-гидразинопиридина

HYNIC-малеимид – 5-малеимидо-2-гидразинийпиридина гидрохлоридом

iTLC – ТСХ пластинка со стекловолокном и слоем силикагеля

K_D – константа диссоциации

MAG3 – меркаптоацетилглицин

MAMA – моноамино-моноамидо-дитиолы

PBS – 0,1 М фосфатный буфер

R_f – фактор удерживания

SDS – додецилсульфат натрия

SUV – стандартизованный уровень накопления

TCEP – трис(2-карбоксиэтил)фосфин

TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

t-тест – непарный двухвостовой t-критерий Стъюдента

АКА – N,N'-метилен-бисакриламида

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

ГВТ – гидролизованный восстановленный технеций

ГФ XV – Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ (DTT) – дитиотреитол

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ОФС – общая фармакопейная статья

ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РМЖ – рак молочной железы

РНК – рибонуклеиновая кислота

РФЛП – радиофармацевтический лекарственный препарат

РХВ – радиохимический выход

РХЧ – радиохимическая чистота

тРФЛП – таргетный радиофармацевтический лекарственный препарат

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФУ – трифторуксусная кислота

ЭДДА – этилендиаминдиуксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cancer mortality-to-incidence ratio as an indicator of cancer management outcomes in Organization for Economic Cooperation and Development countries / E. Choi, S. Lee, B. C. Nhung [и др.] // Epidemiology and Health. – 2017. – Т. 39. – С. e2017006.

2. Cancer statistics, 2023 - Siegel - 2023 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library. – URL: https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21763 (дата обращения: 27.05.2026). – Текст : электронный.

3. Arteaga, C. L. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics / C. L. Arteaga, J. A. Engelman // Cancer Cell. – 2014. – Т. 25. – ERBB receptors. – № 3. – С. 282-303.

4. Роль рецептора эпидермального фактора роста EGFR в эффективности неоадъювантной химиотерапии у больных тройным негативным раком молочной железы / Н. Н. Бабышкина, Т. А. Дронова, Е. А. Замбалова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19. – № 1. – С. 13-20.

5. Северин, Е. С. Молекулярно-физиологические механизмы функционирования мембранных рецепторных систем / Е. С. Северин, М. В. Савватеева // Acta Naturae. – 2011. – Т. 3, № 1. – С. 6–15.

6. ERBB-онкогены – мишени моноклональных антител – выпуск 3, том 77, 2012 – Биохимия. – URL: https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/2012/77-03-0289/ (дата обращения: 27.05.2026). – Текст : электронный.

7. Specific antibodies and sensitive immunoassays for the human epidermal growth factor receptors (HER2, HER3, and HER4) / M. N. Broughton, A. Westgaard, E. Paus [и др.] // Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. – 2017. – Т. 39. – № 6. – С. 1010428317707436.

8. Interobserver reproducibility of tumor uptake quantification with ^{89}Zr-immuno-PET: a multicenter analysis / Y. W. S. Jauw, F. Bensch, A. H. Brouwers [и др.] // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2019. – Т. 46. – Interobserver reproducibility of tumor uptake quantification with 89Zr-immuno-PET. – № 9. – С. 1840-1849.

9. Wolff, A. C. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO–College of American Pathologists Guideline Update / A. C. Wolff, E. M. Hammond, K. H. Allison [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2023. – Vol. 41, No. 22. – P. 3866–3877. – DOI: 10.1200/JCO.22.02864.

10. Влияние различий уровня экспрессии рецепторов стероидных гормонов и экспрессии HER2в первичной опухоли и метастатическом очаге на эффективность монохимиотерапии Эрибулином при диссеминированном раке молочной железы / А. Стукань, Р. Мурашко, С. Кутукова [и др.] // Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69. – № 4. – С. 699-707.

11. Eiger, D. Pertuzumab in HER2-positive early breast cancer: current use and perspectives / D. Eiger, N. F. Pondé, E. de Azambuja // Future Oncology. – 2019. – Т. 15. – Pertuzumab in HER2-positive early breast cancer. – № 16. – С. 1823-1843.

12. Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: results of the randomized phase II CHER-LOB study / V. Guarneri, A. Frassoldati, A. Bottini [и др.] // Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2012. – Т. 30. – Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. – № 16. – С. 1989-1995.

13. Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): the ZEPHIR trial / G. Gebhart, L. E. Lamberts, Z. Wimana [и др.] // Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. – 2016. – Т. 27. – Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity

of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1). – № 4. – С. 619-624.

14. Changes in tumor expression of HER2and hormone receptors status after neoadjuvant chemotherapy in 21,755 patients from the Japanese breast cancer registry / N. Niikura, A. Tomotaki, H. Miyata [и др.] // Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. – 2016. – Т. 27. – № 3. – С. 480-487.

15. HER2in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity / W. M. Hanna, J. Rüschoff, M. Bilous [и др.] // Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2014. – Т. 27. – HER2in situ hybridization in breast cancer. – № 1. – С. 4-18.

16. Total peroxiredoxin expression is associated with survival in patients with follicular lymphoma / P. Peroja, K.-M. Haapasaari, S. Mannisto [и др.] // Virchows Archiv: An International Journal of Pathology. – 2016. – Т. 468. – № 5. – С. 623-630.

17. Брагина, О. Д. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, Р. В. Зельчан, И. Г. Синилкин, А. А. Медведева, М. С. Ларькина // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 125–133.

18. Ernst, P. Structural analysis of biological targets by host:guest crystal lattice engineering / P. Ernst, A. Plückthun, P. R. E. Mittl // Scientific Reports. – 2019. – Т. 9. – Structural analysis of biological targets by host. – № 1. – С. 15199.

19. Lindbo, S. Influence of Histidine-Containing Tags on the Biodistribution of ADAPT Scaffold Proteins / S. Lindbo, J. Garousi, M. Åstrand, H. Honarvar, A. Orlova, S. Hober, V. Tolmachev // Bioconjugate Chemistry. – 2016. – Vol. 27, No. 3. – P. 716–726.

20. Phase I Trial of ^{99m}Tc-$(HE)_3$-G3, a DARPin-Based Probe for Imaging of HER2Expression in Breast Cancer / O. Bragina, V. Chernov, A. Schulga [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2022. – Т. 63. – № 4. – С. 528-535.

21. orobyeva, A. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of 99mTc-labeled DARPin G3 / A. Vorobyeva, A. Schulga, E. Konovalova, R. Güler, J. Löfblom, M. Sandström, J. Garousi, V. Chernov, O. Bragina, A. Orlova, V. Tolmachev, S. M. Deyev // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – Article number 9405.

22. [Interpretation on the report of global cancer statistics 2022] / X. Zhang, L. Yang, S. Liu [и др.] // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese Journal of Oncology]. – 2024. – Т. 46. – № 7. – С. 710-721.

23. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность) / ред. А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова. – Москва : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – 276 с.

24. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Promotes Proliferation and Survival in Osteoprogenitors by Increasing Early Growth Response 2 (EGR2) Expression / A. Chandra, S. Lan, J. Zhu [и др.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Т. 288. – № 28. – С. 20488-20498.

25. Novel substituted quinazolines for potent EGFR tyrosine kinase inhibitors / O. Cruz-López, A. Conejo-García, M. C. Núñez [и др.] // Current Medicinal Chemistry. – 2011. – Т. 18. – № 7. – С. 943-963.

26. Turner, J. H. An introduction to the clinical practice of theranostics in oncology / J. H. Turner // The British Journal of Radiology. – 2018. – Т. 91. – № 1091. – С. 20180440.

27. HER-2 expression in primary and metastatic breast cancer / E. E. Lower, E. Glass, R. Blau, S. Harman // Breast Cancer Research and Treatment. – 2009. – Т. 113. – № 2. – С. 301-306.

28. HER-2, ER, PR status concordance in primary breast cancer and corresponding metastatic lesion in lymph node in Chinese women / M. H. Li, C. L. Hou, C. Wang, A. J. Sun // Pathology, Research and Practice. – 2016. – Т. 212. – № 4. – С. 252-257.

29. Harari, D. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2action in breast cancer / D. Harari, Y. Yarden // Oncogene. – 2000. – Т. 19. – № 53. – С. 6102-6114.

30. Wiesing, U. Theranostics: is it really a revolution? Evaluating a new term in medicine / U. Wiesing // Medicine, Health Care, and Philosophy. – 2019. – Т. 22. – Theranostics. – № 4. – С. 593-597.

31. Assessment of HER2status in breast cancer: why, when and how? / M. Dowsett, T. Cooke, I. Ellis [и др.] // European Journal of Cancer. – 2000. – Т. 36. – Assessment of HER2status in breast cancer. – № 2. – С. 170-176.

32. Specific antibodies and sensitive immunoassays for the human epidermal growth factor receptors (HER2, HER3, and HER4) / M. N. Broughton, A. Westgaard, E. Paus [и др.] // Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. – 2017. – Т. 39. – № 6. – С. 1010428317707436.

33. Bone metastases incidence and its correlation with hormonal and human epidermal growth factor receptor 2 neu receptors in breast cancer / A. Pareek, O. P. Singh, V. Yogi [и др.] // Journal of Cancer Research and Therapeutics. – 2019. – Т. 15. – № 5. – С. 971-975.

34. Tolmachev, V. Influence of labelling methods on biodistribution and imaging properties of radiolabelled peptides for visualisation of molecular therapeutic targets / V. Tolmachev, A. Orlova // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – Т. 17. – № 24. – С. 2636-2655.

35. Liu, S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals / S. Liu // Chemical Society Reviews. – 2004. – Vol. 33, No. 7. – P. 445–461. – DOI: 10.1039/B309961J.

36. Cherry, S. R. Physics in nuclear medicine : 4 / S. R. Cherry, J. A. Sorenson, M. E. Phelps. – Saunders/Elsevier, 2012. – 546 с.

37. Dash, A. Targeted radionuclide therapy--an overview / A. Dash, F. F. R. Knapp, M. R. A. Pillai // Current Radiopharmaceuticals. – 2013. – Т. 6. – № 3. – С. 152-180.

38. Zakaly, H. M. H. Dosimetry Assessment of Injected ^{89}Zr-Labeled Monoclonal Antibodies in Humans / H. M. H. Zakaly, M. Y. A. Mostafa, M. Zhukovsky // Radiation Research. – 2019. – Т. 191. – № 5. – С. 466-474.

39. Anderson, C. J. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research / C. J. Anderson, R. Ferdani // Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals. – 2009. – Т. 24. – Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer. – № 4. – С. 379-393.

40. Recent Advances in 18F Radiochemistry: A Focus on B-^{18}F, Si-^{18}F, Al-^{18}F, and C-^{18}F Radiofluorination via Spirocyclic Iodonium Ylides / V. Bernard-Gauthier, M. L. Lepage, B. Waengler [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2018. – Т. 59. – Recent Advances in 18F Radiochemistry. – № 4. – С. 568-572.

41. Labeling of monoclonal antibodies with indium-111: Technique and advantages compared to radioiodine labeling / S. Halpern, P. Stern, P. Hagan [et al.]. – Text : electronic // Radioimmunoimaging and radioimmunotherapy. – 1983. – Labeling of monoclonal antibodies with indium-111. – P. 197-205. – URL: https://inis.iaea.org/records/v7dmm-q7w07 (date accessed: 27.05.2026).

42. Banerjee, S. Evolution of Tc-99м in diagnostic radiopharmaceuticals / S. Banerjee, M. R. Pillai, N. Ramamoorthy // Seminars in Nuclear Medicine. – 2001. – Т. 31. – № 4. – С. 260-277.

43. Biodistribution and Radiation Dosimetry of the Anti-HER2Affibody Molecule ^{68}Ga-ABY-025 in Breast Cancer Patients / M. Sandström, K. Lindskog, I. Velikyan [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2016. – Т. 57. – № 6. – С. 867-871.

44. Zanzonico, P. Principles of nuclear medicine imaging: planar, SPECT, PET, multi-modality, and autoradiography systems / P. Zanzonico // Radiation Research. – 2012. – Т. 177. – Principles of nuclear medicine imaging. – № 4. – С. 349-364.

45. International Atomic Energy Agency. Technetium-99м radiopharmaceuticals : status and trends : IAEA radioisotopes and

radiopharmaceuticals series / International Atomic Energy Agency. – Vienna : International Atomic Energy Agency, 2009.

46. Nitrido Technetium-99 m Core in Radiopharmaceutical Applications: Four Decades of Research. – URL: https://www.mdpi.com/2304-6740/8/1/3 (дата обращения: 27.05.2026). – Текст : электронный.

47. Chakraborty, S. ^{99m}Tc and ^{111}In-labeling of small biomolecules: bifunctional chelators and related coordination chemistry / S. Chakraborty, S. Liu // Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2010. – Т. 10. – (99m)Tc and (111)In-labeling of small biomolecules. – № 11. – С. 1113-1134.

48. Preparation and structural characterization of monoamine-monoamide bis(thiol) oxo complexes of technetium(V) and rhenium(V) | Inorganic Chemistry. – URL: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ic00080a022 (дата обращения: 27.05.2026). – Текст : электронный.

49. Metal carbonyl syntheses XXII. Low-pressure carbonylation of [MOCl4]− and [MO4]−. The technetium(I) and rhenium(I) complexes [NEt4]2[MCl3(CO)3] / R. Alberto, R. Schibli, A. Egli [и др.] // Journal of Organometallic Chemistry. – 1995. – Т. 492. – № 2. – С. 217-224.

50. Labeling peptides with technetium-99м using a bifunctional chelator of a N-hydroxysuccinimide ester of mercaptoacetyltriglycine / D. J. Hnatowich, T. Qu, F. Chang [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 1998. – Т. 39. – № 1. – С. 56-64.

51. Rajagopalan, R. Preparation, Characterization, and Biological Evaluation of Technetium(V) and Rhenium(V) Complexes of Novel Heterocyclic Tetradentate N3S Ligands / R. Rajagopalan, G. D. Grummon, J. Bugaj, L. S. Hallemann, E. G. Webb, M. E. Marmion, J.-L. Vanderheyden, A. Srinivasan // Bioconjugate Chemistry. – 1997. – Vol. 8, No. 3. – P. 407–415. – DOI: 10.1021/bc9700401.

52. Rhenium(V) and Technetium(V) Oxo Complexes of an N(2)N’S Peptidic Chelator: Evidence of Interconversion between the Syn and Anti Conformations / E. Wong, T. Fauconnier, S. Bennett [и др.] // Inorganic Chemistry. – 1997. – Т. 36. –

Rhenium(V) and Technetium(V) Oxo Complexes of an N(2)N'S Peptidic Chelator. – № 25. – С. 5799-5808.

53. Preparation of hydrazino-modified proteins and their use for the synthesis of 99mTc-protein conjugates / D. A. Schwartz, M. J. Abrams, M. M. Hauser [и др.] // Bioconjugate Chemistry. – 1991. – Т. 2. – № 5. – С. 333-336.

54. Tumor imaging with technetium-99м-labeled hydrazinonicotinamide-Fab' conjugates / M. E. Ultee, G. J. Bridger, M. J. Abrams [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 1997. – Т. 38. – № 1. – С. 133-138.

55. ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC: a new ^{99m}Tc-labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumours; first clinical results and intra-patient comparison with 111In-labelled octreotide derivatives / C. Decristoforo, S. J. Mather, W. Cholewinski [и др.] // European Journal of Nuclear Medicine. – 2000. – Т. 27. – 99mTc-EDDA/HYNIC-TOC. – № 9. – С. 1318-1325.

56. ^{99m}Tc-labeled chemotactic peptides: influence of coligand on distribution of molecular species and infection imaging properties. Synthesis and structural characterization of model complexes with the {Re(η2-HNNC5H4N)(η1-NNC5H4N)} core / J. W. Babich*, W. Graham Coco, S. Barrow [и др.] // Inorganica Chimica Acta. – 2000. – Т. 309. – 99mTc-labeled chemotactic peptides. – № 1. – С. 123-136.

57. The Chemistry of Technetium–Water Complexes within the Manganese Triad: Challenges and Perspectives - Alberto - 2009 - European Journal of Inorganic Chemistry - Wiley Online Library. – URL: https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejic.200800909 (дата обращения: 27.05.2026). – Текст : электронный.

58. Alberto, R. First Application of fac-[99mTc(OH2)3(CO)3]+ in Bioorganometallic Chemistry: Design, Structure, and in Vitro Affinity of a 5-HT1A Receptor Ligand Labeled with 99mTc / R. Alberto, R. Schibli, A. P. Schubiger, U. Abram, H.-J. Pietzsch, B. Johannsen // Journal of the American Chemical Society. – 1999. – Vol. 121, No. 25. – P. 6076–6077.

59. Schibli, R. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals / R. Schibli, P. A. Schubiger // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2002. – Т. 29. – № 11. – С. 1529-1542.

60. Tolmachev, V. Affibody Molecules as Targeting Vectors for PET Imaging / V. Tolmachev, A. Orlova // Cancers. – 2020. – Т. 12. – № 3. – С. 651.

61. Liu, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides / S. Liu // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2008. – Т. 60. – № 12. – С. 1347-1370.

62. ^{89}Zr-Trastuzumab PET/CT for Detection of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastases in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Primary Breast Cancer / G. A. Ulaner, D. M. Hyman, S. K. Lyashchenko [и др.] // Clinical Nuclear Medicine. – 2017. – Т. 42. – № 12. – С. 912-917.

63. Detection of HER2-Positive Metastases in Patients with HER2-Negative Primary Breast Cancer Using 89Zr-Trastuzumab PET/CT / G. A. Ulaner, D. M. Hyman, D. S. Ross [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2016. – Т. 57. – № 10. – С. 1523-1528.

64. Modular strategy for the construction of radiometalated antibodies for positron emission tomography based on inverse electron demand Diels-Alder click chemistry / B. M. Zeglis, P. Mohindra, G. I. Weissmann [и др.] // Bioconjugate Chemistry. – 2011. – Т. 22. – № 10. – С. 2048-2059.

65. ^{64}Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer / K. Tamura, H. Kurihara, K. Yonemori [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2013. – Т. 54. – № 11. – С. 1869-1875.

66. Patra, M. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes / M. Patra, A. Bauman, C. Mari, C. A. Fischer, O. Blacque, D. Häussinger, G. Gasser, T. L. Mindt // Chemical Communications. – 2014. – Vol. 50, No. 78. – P. 11523–11525.

67. Development of ^{64}Cu-NOTA-Trastuzumab for HER2Targeting: A Radiopharmaceutical with Improved Pharmacokinetics for Human Studies / S.-K. Woo, S. J. Jang, M.-J. Seo [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2019. – Т. 60. – Development of 64Cu-NOTA-Trastuzumab for HER2Targeting. – № 1. – С. 26-33.

68. Molecular design of radiocopper-labelled Affibody molecules / V. Tolmachev, T. J. Grönroos, C.-B. Yim [и др.] // Scientific Reports. – 2018. – Т. 8. – № 1. – С. 6542.

69. Lapatinib and 17AAG reduce ^{89}Zr-trastuzumab-F(ab')$_2$ uptake in SK-BR-3 tumor xenografts / T. H. Oude Munnink, E. G. E. de Vries, S. R. Vedelaar [и др.] // Molecular Pharmaceutics. – 2012. – Т. 9. – № 11. – С. 2995-3002.

70. Imaging the pharmacodynamics of HER2degradation in response to Hsp90 inhibitors / P. M. Smith-Jones, D. B. Solit, T. Akhurst [и др.] // Nature Biotechnology. – 2004. – Т. 22. – № 6. – С. 701-706.

71. Lam, K. Development and preclinical studies of ^{64}Cu-NOTA-pertuzumab F(ab')2 for imaging changes in tumor HER2expression associated with response to trastuzumab by PET/CT / K. Lam, C. Chan, R. M. Reilly // mAbs. – 2017. – Т. 9. – № 1. – С. 154-164.

72. ^{89}Zr-Labeled Versus ^{124}I-Labeled αHER2Fab with Optimized Plasma Half-Life for High-Contrast Tumor Imaging In Vivo / C. T. Mendler, T. Gehring, H.-J. Wester [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2015. – Т. 56. – № 7. – С. 1112-1118.

73. Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2 / G. P. Adams, R. Schier, A. M. McCall [и др.] // British Journal of Cancer. – 1998. – Т. 77. – № 9. – С. 1405-1412.

74. Practical theoretic guidance for the design of tumor-targeting agents / K. D. Wittrup, G. M. Thurber, M. M. Schmidt, J. J. Rhoden // Methods in Enzymology. – 2012. – Т. 503. – С. 255-268.

75. Enhanced tumor specificity of 741F8-1 (sFv')$_2$, an anti-c-erbB-2 single-chain Fv dimer, mediated by stable radioiodine conjugation / G. P. Adams,

J. E. McCartney, E. J. Wolf [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 1995. – Т. 36. – № 12. – С. 2276-2281.

76. A single treatment of yttrium-90-labeled CHX-A"-C6.5 diabody inhibits the growth of established human tumor xenografts in immunodeficient mice / G. P. Adams, C. C. Shaller, E. Dadachova [и др.] // Cancer Research. – 2004. – Т. 64. – № 17. – С. 6200-6206.

77. Gallium-68-labeled anti-HER2single-chain Fv fragment: development and in vivo monitoring of HER2expression / M. Ueda, H. Hisada, T. Temma [и др.] // Molecular Imaging and Biology. – 2015. – Т. 17. – Gallium-68-labeled anti-HER2single-chain Fv fragment. – № 1. – С. 102-110.

78. Optimizing radiolabeled engineered anti-p185HER2antibody fragments for in vivo imaging / T. Olafsen, V. E. Kenanova, G. Sundaresan [и др.] // Cancer Research. – 2005. – Т. 65. – № 13. – С. 5907-5916.

79. Preclinical Evaluation of ^{18}F-Labeled Anti-HER2Nanobody Conjugates for Imaging HER2Receptor Expression by Immuno-PET / G. Vaidyanathan, D. McDougald, J. Choi [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2016. – Т. 57. – № 6. – С. 967-973.

80. Preclinical screening of anti-HER2nanobodies for molecular imaging of breast cancer / I. Vaneycken, N. Devoogdt, N. Van Gassen [и др.] // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2011. – Т. 25. – № 7. – С. 2433-2446.

81. Phase I Trial of ^{131}I-GMIB-Anti-HER2-VHH1, a New Promising Candidate for HER2-Targeted Radionuclide Therapy in Breast Cancer Patients / M. D'Huyvetter, J. D. Vos, V. Caveliers [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2021. – Т. 62. – № 8. – С. 1097-1105.

82. ^{131}I-labeled Anti-HER2Camelid sdAb as a Theranostic Tool in Cancer Treatment / M. D'Huyvetter, J. De Vos, C. Xavier [и др.] // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. – 2017. – Т. 23. – № 21. – С. 6616-6628.

83. Fluorine-18 Labeling of the HER2-Targeting Single-Domain Antibody 2Rs15d Using a Residualizing Label and Preclinical Evaluation / Z. Zhou, G. Vaidyanathan, D. McDougald [и др.] // Molecular Imaging and Biology. – 2017. – Т. 19. – № 6. – С. 867-877.

84. ^{18}F-nanobody for PET imaging of HER2overexpressing tumors / C. Xavier, A. Blykers, I. Vaneycken [и др.] // Nuclear Medicine and Biology. – 2016. – Т. 43. – № 4. – С. 247-252.

85. Phase I Study of ^{68}Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2Expression in Breast Carcinoma / M. Keyaerts, C. Xavier, J. Heemskerk [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2016. – Т. 57. – № 1. – С. 27-33.

86. Measuring HER2-Receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using ^{68}Ga-ABY-025 Affibody PET/CT / J. Sörensen, I. Velikyan, D. Sandberg [и др.] // Theranostics. – 2016. – Т. 6. – № 2. – С. 262-271.

87. ADAPT, a Novel Scaffold Protein-Based Probe for Radionuclide Imaging of Molecular Targets That Are Expressed in Disseminated Cancers / J. Garousi, S. Lindbo, J. Nilvebrant [и др.] // Cancer Research. – 2015. – Т. 75. – № 20. – С. 4364-4371.

88. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2molecular imaging / R. Goldstein, J. Sosabowski, M. Livanos [и др.] // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2015. – Т. 42. – № 2. – С. 288-301.

89. Phase I Study of ^{99m}Tc-ADAPT6, a Scaffold Protein-Based Probe for Visualization of HER2Expression in Breast Cancer / O. Bragina, E. von Witting, J. Garousi [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2021. – Т. 62. – № 4. – С. 493-499.

90. Indirect Radioiodination of DARPin G3 Using N-succinimidyl-Para-Iodobenzoate Improves the Contrast of HER2Molecular Imaging / A. Vorobyeva, A. Schulga, S. S. Rinne [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Т. 20. – № 12. – С. 3047.

91. Comparative Evaluation of Two DARPin Variants: Effect of Affinity, Size, and Label on Tumor Targeting Properties / S. Deyev, A. Vorobyeva, A. Schulga [и др.] // Molecular Pharmaceutics. – 2019. – Т. 16. – Comparative Evaluation of Two DARPin Variants. – № 3. – С. 995-1008.

92. Wållberg, H. Slow internalization of anti-HER2synthetic affibody monomer ^{111}In-DOTA-ZHER2:342-pep2: implications for development of labeled tracers / H. Wållberg, A. Orlova // Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals. – 2008. – Т. 23. – Slow internalization of anti-HER2synthetic affibody monomer 111In-DOTA-ZHER2. – № 4. – С. 435-442.

93. Tumor imaging using a picomolar affinity HER2binding affibody molecule / A. Orlova, M. Magnusson, T. L. J. Eriksson [и др.] // Cancer Research. – 2006. – Т. 66. – № 8. – С. 4339-4348.

94. A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to HER2/ C. Zahnd, E. Wyler, J. M. Schwenk [и др.] // Journal of Molecular Biology. – 2007. – Т. 369. – № 4. – С. 1015-1028.

95. Tolmachev, V. Tumor Targeting Using Affibody Molecules: Interplay of Affinity, Target Expression Level, and Binding Site Composition / V. Tolmachev, T. A. Tran, D. Rosik, A. Sjöberg, L. Abrahmsén, A. Orlova // Journal of Nuclear Medicine. – 2012. – Vol. 53, No. 6. – P. 953–960. – DOI: 10.2967/jnumed.111.101527.

96. ^{64}Cu-Labeled Affibody Molecules for Imaging of HER2Expressing Tumors / Z. Cheng, O. P. De Jesus, D. J. Kramer [и др.] // Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging. – 2010. – Т. 12. – № 3. – С. 316-324.

97. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic ^{111}In- or ^{68}Ga-labeled affibody molecules / R. P. Baum, V. Prasad, D. Müller [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2010. – Т. 51. – № 6. – С. 892-897.

98. Indium-111-labeled trastuzumab scintigraphy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer / P. J. Perik, M. N. Lub-De Hooge, J. A. Gietema [и др.] // Journal of Clinical Oncology: Official

Journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2006. – Т. 24. – № 15. – С. 2276-2282.

99. Targeting of HER2-expressing tumors using ^{111}In-ABY-025, a second-generation affibody molecule with a fundamentally reengineered scaffold / S. Ahlgren, A. Orlova, H. Wållberg [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2010. – Т. 51. – № 7. – С. 1131-1138.

100. First-in-human molecular imaging of HER2expression in breast cancer metastases using the ^{111}In-ABY-025 affibody molecule / J. Sörensen, D. Sandberg, M. Sandström [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2014. – Т. 55. – № 5. – С. 730-735.

101. ^{89}Zr-Trastuzumab: Evaluation of Radiation Dosimetry, Safety, and Optimal Imaging Parameters in Women with HER2-Positive Breast Cancer / R. Laforest, S. E. Lapi, R. Oyama [и др.] // Molecular Imaging and Biology. – 2016. – Т. 18. – № 6. – С. 952-959.

102. First-in-Human Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeted Imaging Using ^{89}Zr-Pertuzumab PET/CT: Dosimetry and Clinical Application in Patients with Breast Cancer / G. A. Ulaner, S. K. Lyashchenko, C. Riedl [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2018. – Т. 59. – First-in-Human Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeted Imaging Using 89Zr-Pertuzumab PET/CT. – № 6. – С. 900-906.

103. PET of HER2Expression with a Novel ^{18}FAl Labeled Affibody / Y. Xu, Z. Bai, Q. Huang [и др.] // Journal of Cancer. – 2017. – Т. 8. – № 7. – С. 1170-1178.

104. PET imaging of a ^{68}Ga labeled modified HER2affibody in breast cancers: from xenografts to patients / Y. Xu, L. Wang, D. Pan [и др.] // The British Journal of Radiology. – 2019. – Т. 92. – PET imaging of a 68Ga labeled modified HER2affibody in breast cancers. – № 1104. – С. 20190425.

105. Synthesis of a novel ^{89}Zr-labeled HER2affibody and its application study in tumor PET imaging / Y. Xu, L. Wang, D. Pan [и др.] // EJNMMI research. – 2020. – Т. 10. – № 1. – С. 58.

106. Impact of ^{68}Ga-NOTA-MAL-MZHER2PET imaging in advanced gastric cancer patients and therapeutic response monitoring / N. Zhou, C. Liu, X. Guo [и др.] // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2021. – Т. 48. – № 1. – С. 161-175.

107. Phase I clinical evaluation of ^{99m}Tc-labeled Affibody molecule for imaging HER2expression in breast cancer / O. Bragina, V. Chernov, M. Larkina [и др.] // Theranostics. – 2023. – Т. 13. – № 14. – С. 4858-4871.

108. Structural model for the interaction of a designed Ankyrin Repeat Protein with the human epidermal growth factor receptor 2 / V. C. Epa, O. Dolezal, L. Doughty [и др.] // PloS One. – 2013. – Т. 8. – № 3. – С. e59163.

109. Designed Ankyrin Repeat Proteins: A New Approach to Mimic Complex Antigens for Diagnostic Purposes? / S. Hausammann, M. Vogel, J. A. Kremer Hovinga [и др.] // PLoS ONE. – 2013. – Т. 8. – Designed Ankyrin Repeat Proteins. – № 4. – С. e60688.

110. A rapid, site-selective and efficient route to the dual modification of DARPins †Electronic supplementary information (ESI) available: LC-MS spectra for all reactions with proteins described herein. See DOI: 10.1039/c4cc00053f Click here for additional data file. / P. Moody, V. Chudasama, R. I. Nathani [и др.] // Chemical Communications (Cambridge, England). – 2014. – Т. 50. – A rapid, site-selective and efficient route to the dual modification of DARPins †Electronic supplementary information (ESI) available. – № 38. – С. 4898-4900.

111. Non-invasive in vivo imaging of tumour-associated cathepsin B by a highly selective inhibitory DARPin / L. Kramer, M. Renko, J. Završnik [и др.] // Theranostics. – 2017. – Т. 7. – № 11. – С. 2806-2821.

112. Directed evolution of anti-HER2DARPins by SNAP display reveals stability/function trade-offs in the selection process / G. Houlihan, P. Gatti-Lafranconi, D. Lowe, F. Hollfelder // Protein engineering, design & selection: PEDS. – 2015. – Т. 28. – № 9. – С. 269-279.

113. Amyloid-β peptide-specific DARPins as a novel class of potential therapeutics for Alzheimer disease / M. Hanenberg, J. McAfoose, L. Kulic [и др.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Т. 289. – № 39. – С. 27080-27089.

114. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins / H. K. Binz, M. T. Stumpp, P. Forrer [и др.] // Journal of Molecular Biology. – 2003. – Т. 332. – Designing repeat proteins. – № 2. – С. 489-503.

115. Lactose Fed-Batch Overexpression of Recombinant Metalloproteins in *Escherichia coli* BL21(DE3): Process Control Yielding High Levels of Metal-Incorporated, Soluble Protein / B. J. Hoffman, J. A. Broadwater, P. Johnson [и др.] // Protein Expression and Purification. – 1995. – Т. 6. – Lactose Fed-Batch Overexpression of Recombinant Metalloproteins in *Escherichia coli* BL21(DE3). – № 5. – С. 646-654.

116. Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of Escherichia coli / J. Ou, L. Wang, X. Ding [и др.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2004. – Т. 314. – № 1. – С. 174-180.

117. Stumpp, M. T. DARPins: a true alternative to antibodies / M. T. Stumpp, P. Amstutz // Current Opinion in Drug Discovery & Development. – 2007. – Т. 10. – DARPins. – № 2. – С. 153-159.

118. DARPins: an efficient targeting domain for lentiviral vectors / R. C. Münch, M. D. Mühlebach, T. Schaser [и др.] // Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. – 2011. – Т. 19. – DARPins. – № 4. – С. 686-693.

119. Steiner, D. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display / D. Steiner, P. Forrer, A. Plückthun // Journal of Molecular Biology. – 2008. – Т. 382. – № 5. – С. 1211-1227.

120. Designed ankyrin repeat proteins: a novel tool for testing epidermal growth factor receptor 2 expression in breast cancer / J.-P. Theurillat, B. Dreier, G. Nagy-Davidescu [и др.] // Modern Pathology: An Official Journal of the United

States and Canadian Academy of Pathology, Inc. – 2010. – Т. 23. – Designed ankyrin repeat proteins. – № 9. – С. 1289-1297.

121. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size / C. Zahnd, M. Kawe, M. T. Stumpp [и др.] // Cancer Research. – 2010. – Т. 70. – Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins. – № 4. – С. 1595-1605.

122. Structural basis for eliciting a cytotoxic effect in HER2-overexpressing cancer cells via binding to the extracellular domain of HER2/ C. Jost, J. Schilling, R. Tamaskovic [и др.] // Structure. – 2013. – Т. 21. – № 11. – С. 1979-1991.

123. Fiedler, U. Abstract P4-21-18: Pre-clinical antitumor activity, tumor localization, and pharmacokinetics of MP0274, an apoptosis inducing, biparatopic HER2-targeting DARPin® / U. Fiedler, C. Metz, C. Zitt, R. Bessey, M. Béhé, A. Blanc, R. Schibli, I. Dolado, J. Herbst, K. M. Dawson, J. Kiemle-Kallee // Cancer Research. – 2017. – Vol. 77, No. 4, Supplement. – P. P4-21-18. – DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS16-P4-21-18

124. Molecular Partners AG. A Phase 1, First-in-human, Single-arm, Multi-center, Open-label, Repeated-Dose, Dose-escalation Study to Assess Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of MP0274 in Patients With Advanced HER2-positive Solid Tumors. First-in-human Study to Investigate Safety, Blood Levels and Activity of MP0274 in Cancer Patients With HER2-positive Solid Tumors / Molecular Partners AG. – clinicaltrials.gov, 2022. – URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT03084926 (дата обращения: 03.06.2026). – Текст : электронный.

125. Высокоспецифичный гибридный белок DARPin-mCherry для флуоресцентной визуализации клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2 – выпуск 12, том 79, 2014 – Биохимия. – URL: https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/2014/79-12-1698/ (дата обращения: 03.06.2026). – Текст : электронный.

126. Comparative Evaluation of Radioiodine and Technetium-Labeled DARPin 9_29 for Radionuclide Molecular Imaging of HER2Expression in Malignant

Tumors / A. Vorobyeva, O. Bragina, M. Altai [и др.] // Contrast Media & Molecular Imaging. – 2018. – Т. 2018. – С. 6930425.

127. Брагина, О. Д. Однофотонная эмиссионная компьютерная томография с 99mTc-DARPin9_29 для радионуклидной диагностики рака молочной железы с гиперэкспрессией Her2/neu: первый опыт клинического применения / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, Р. В. Зельчан, А. А. Медведева, Е. Ю. Гарбуков, С. М. Деев, В. М. Толмачев // Молекулярная медицина. – 2021. – Т. 19, № 1. – С. 41–46.

128. Брагина, О. Д. Результаты I фазы клинического исследования нового радиофармпрепарата на основе меченных 99mТехнецием рекомбинантных адресных молекул DARPin9_29 для радионуклидной диагностики рака молочной железы с гиперэкспрессией Her2/neu / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, М. С. Ларькина, Е. С. Стасюк, Р. В. Зельчан, А. А. Медведева, Е. Ю. Гарбуков, Р. Ю. Вернадский, С. М. Деев, В. М. Толмачев // Молекулярная медицина. – 2021. – Т. 19, № 2. – С. 41–48.

129. Direct Intra-Patient Comparison of Scaffold Protein-Based Tracers, [99mTc]Tc-ADAPT6 and [99mTc]Tc-(HE)3-G3, for Imaging of HER2-Positive Breast Cancer / O. Bragina, V. Chernov, A. Schulga [и др.] // Cancers. – 2023. – Т. 15. – № 12. – С. 3149.

130. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins / M. P. Malakhov, M. R. Mattern, O. A. Malakhova [и др.] // Journal of Structural and Functional Genomics. – 2004. – Т. 5. – № 1-2. – С. 75-86.

131. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry / B. Ma, K. Zhang, C. Hendrie [и др.] // Rapid communications in mass spectrometry: RCM. – 2003. – Т. 17. – PEAKS. – № 20. – С. 2337-2342.

132. Molecular design and optimization of ^{99m}Tc-labeled recombinant affibody molecules improves their biodistribution and imaging properties / H. Wållberg, A. Orlova, M. Altai [и др.] // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 2011. – Т. 52. – № 3. – С. 461-469.

133. Comparative evaluation of tumor targeting using the anti-HER2ADAPT scaffold protein labeled at the C-terminus with indium-111 or technetium-99м / J. Garousi, S. Lindbo, B. Mitran [и др.] // Scientific Reports. – 2017. – Т. 7. – № 1. – С. 14780.

134. Preclinical Evaluation of ^{99m}Tc-ZHER2:41071, a Second-Generation Affibody-Based HER2-Visualizing Imaging Probe with a Low Renal Uptake / M. Oroujeni, S. S. Rinne, A. Vorobyeva [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – Preclinical Evaluation of 99mTc-ZHER2. – № 5. – С. 2770.

135. Liu, S. ^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals / S. Liu, D. S. Edwards // Chemical Reviews. – 1999. – Т. 99. – № 9. – С. 2235-2268.

136. Ruan, Q. A Simple Kit Formulation for Preparation and Exploratory Human Studies of a Novel 99mTc-Labeled Fibroblast Activation Protein Inhibitor Tracer for Imaging of the Fibroblast Activation Protein in Cancers / Q. Ruan, C. Zhou, Q. Wang, F. Kang, Y. Jiang, G. Li, J. Feng, S. Zong, J. Zhang, J. Wang // Molecular Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 20, No. 6. – P. 2942–2950.

137. Positioning of ^{99m}Tc-chelators influences radiolabeling, stability and biodistribution of Affibody molecules : Tetrahedron Young Investigator Award 2009: Carlos F. Barbas, III / T. Ekblad, A. Orlova, J. Feldwisch [и др.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2009. – Т. 19. – № 14. – С. 3912-3914.

138. Comparative Preclinical Evaluation of HER2-Targeting ABD-Fused Affibody® Molecules 177Lu-ABY-271 and 177Lu-ABY-027: Impact of DOTA Position on ABD Domain / Y. Liu, A. Vorobyeva, T. Xu [и др.] // Pharmaceutics. – 2021. – Т. 13. – Comparative Preclinical Evaluation of HER2-Targeting ABD-Fused Affibody® Molecules 177Lu-ABY-271 and 177Lu-ABY-027. – № 6. – С. 839.

139. Position for site-specific attachment of a DOTA chelator to synthetic affibody molecules has a different influence on the targeting properties of 68Ga- compared to 111in-labeled conjugates / H. Honarvar, J. Strand, A. Perols [и др.] // Molecular Imaging. – 2014. – Т. 13.

140. Tofe, A. J. In vitro stabilization of a low-tin bone-imaging agent (99mTc-Sn-HEDP) by ascorbic acid / A. J. Tofe, M. D. Francis // Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine. – 1976. – Т. 17. – № 9. – С. 820-825.

141. Young, A. Abstract A046: Development of a scoring system to classify HER2 protein expression in circulating tumor cells through immunofluorescence following isolation using Parsortix® instruments / A. Young, L. Vlietinck, B. Edwards, L. Cook, C. Johnson, M. Ciccioli, A.-S. Pailhes-Jimenez // Clinical Cancer Research. – 2024. – Vol. 30, No. 21_Supplement. – P. A046.

142. Malmberg, J. Imaging agents for in vivo molecular profiling of disseminated prostate cancer: Cellular processing of ^{111}In-labeled CHX-A″DTPA-trastuzumab and anti-HER2ABY-025 Affibody in prostate cancer cell lines / J. Malmberg, V. Tolmachev, A. Orlova // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2011. – Т. 2. – Imaging agents for in vivo molecular profiling of disseminated prostate cancer. – № 3. – С. 523-528.

143. On the prevention of kidney uptake of radiolabeled DARPins / M. Altai, J. Garousi, S. S. Rinne [и др.] // EJNMMI Research. – 2020. – Т. 10. – С. 7.

144. Comparison of tumor-targeting properties of directly and indirectly radioiodinated designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 variants for molecular imaging of HER2/ A. Vorobyeva, A. Schulga, E. Konovalova [и др.] // International Journal of Oncology. – 2019. – Т. 54. – № 4. – С. 1209-1220.

145. Effect of a radiolabel biochemical nature on tumor-targeting properties of EpCAM-binding engineered scaffold protein DARPin Ec1 / S. M. Deyev, A. Vorobyeva, A. Schulga [и др.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Т. 145. – С. 216-225.

146. De novo metastasis in breast cancer: occurrence and overall survival stratified by molecular subtype / D. J. Press, M. E. Miller, E. Liederbach [и др.] // Clinical & Experimental Metastasis. – 2017. – Т. 34. – De novo metastasis in breast cancer. – № 8. – С. 457-465.

147. Metastatic pattern in esophageal and gastric cancer: Influenced by site and histology / M. H. Verstegen, M. Harker, C. van de Water [и др.] // World Journal of Gastroenterology. – 2020. – Т. 26. – Metastatic pattern in esophageal and gastric cancer. – № 39. – С. 6037-6046.

148. Metastatic spread in patients with gastric cancer / M. Riihimäki, A. Hemminki, K. Sundquist [и др.] // Oncotarget. – 2016. – Т. 7. – № 32. – С. 52307-52316.

149. Clinical landscape of cancer metastases / M. Riihimäki, H. Thomsen, K. Sundquist [и др.] // Cancer Medicine. – 2018. – Т. 7. – № 11. – С. 5534-5542.

150. Increasing the Net Negative Charge by Replacement of DOTA Chelator with DOTAGA Improves the Biodistribution of Radiolabeled Second-Generation Synthetic Affibody Molecules / K. Westerlund, H. Honarvar, E. Norrström [и др.] // Molecular Pharmaceutics. – 2016. – Т. 13. – № 5. – С. 1668-1678.

151. Evaluation of a HER2-targeting affibody molecule combining an N-terminal HEHEHE-tag with a GGGC chelator for ^{99m}Tc-labelling at the C terminus / H. Lindberg, C. Hofström, M. Altai [и др.] // Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. – 2012. – Т. 33. – № 3. – С. 641-651.

152. Hosseinimehr, S. J. Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: considerations for targeting peptide conjugate design / S. J. Hosseinimehr, V. Tolmachev, A. Orlova // Drug Discovery Today. – 2012. – Т. 17. – Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides. – № 21-22. – С. 1224-1232.

153. Incorporation of a Hydrophilic Spacer Reduces Hepatic Uptake of HER2-Targeting Affibody-DM1 Drug Conjugates / H. Ding, M. Altai, S. S. Rinne [и др.] // Cancers. – 2019. – Т. 11. – № 8. – С. 1168.

154. Order of amino acids in C-terminal cysteine-containing peptide-based chelators influences cellular processing and biodistribution of 99mTc-labeled recombinant Affibody molecules / M. Altai, H. Wållberg, A. Orlova [и др.] // Amino Acids. – 2012. – Т. 42. – № 5. – С. 1975-1985.

155. Deyev, S. M. Influence of the Position and Composition of Radiometals and Radioiodine Labels on Imaging of EpCAM Expression in Prostate Cancer Model Using the DARPin Ec1 / S. M. Deyev, T. Xu, Y. Liu, A. Schulga, E. Konovalova, J. Garousi, S. S. Rinne, M. Larkina, H. Ding, T. Gräslund, A. Orlova, V. Tolmachev, A. Vorobyeva // Cancers. – 2021. – Vol. 13, No. 14. – Article number 3589.

156. Comparative evaluation of dimeric and monomeric forms of ADAPT scaffold protein for targeting of HER2-expressing tumours / J. Garousi, S. Lindbo, J. Borin [и др.] // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V. – 2019. – Т. 134. – С. 37-48.

157. Effect of Inter-Domain Linker Composition on Biodistribution of ABD-Fused Affibody-Drug Conjugates Targeting HER2/ T. Xu, J. Zhang, M. Oroujeni [и др.] // Pharmaceutics. – 2022. – Т. 14. – № 3. – С. 522.

158. Nielsen, R. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease / R. Nielsen, E. I. Christensen, H. Birn // Kidney International. – 2016. – Т. 89. – Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption. – № 1. – С. 58-67.

159. Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin: SPECT and biodistribution studies in megalin-deficient mice / E. Vegt, M. Melis, A. Eek [и др.] // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2011. – Т. 38. – Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin. – № 4. – С. 623-632.

160. Марук, А. Я. Новые радиофармпрепараты на основе ^{99m}Tc с применением бифункциональных хелатирующих агентов / А. Я. Марук, А. Б. Брускин, Г. Е. Кодина (Микуленок) // Радиохимия. – 2011. – Т. 53. – № 4. – С. 289-300.

161. Tolmachev, V. The emerging role of radionuclide molecular imaging of HER2expression in breast cancer / V. Tolmachev, A. Orlova, J. Sörensen // Seminars in Cancer Biology. – 2021. – Т. 72. – С. 185-197.

162. Plückthun, A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins): binding proteins for research, diagnostics, and therapy / A. Plückthun // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2015. – Т. 55. – Designed ankyrin repeat proteins (DARPins). – С. 489-511.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Проект фармакопейной статьи по контролю качества РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение №_____

Дата регистрации «____» _____ 20___г.

Организация, страна, индекс, область, город, улица

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

(Проект)

_____(номер)

«DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc»

(торговое наименование лекарственного препарата)

_____

(международное непатентованное наименование)

Раствор для внутривенного введения, 350 – 600 МБк/фл, на дату и время изготовления

(лекарственная форма, дозировка)

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Стерильный лиофилизат химического предшественника белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$ для изготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», специфичного к HER2.

Вспомогательные вещества: фосфор в виде ортофосфатов натрия различной степени замещения, D-маннит, ПЭГ-4000, дигидрат хлорида олова (II), глюконат натрия, тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Состав на 1 флакон:

DARPin G3-$(G_3S)_3C$	3,3 мг
Фосфор в виде ортофосфатов натрия различной степени замещения	17 мг
D-маннит	0,66 мг
полиэтиленгликоль-4000 (ПЭГ-4000)	0,33 мг
Олова (II) Хлорид	0,075 мг
Натрия глюконат	5 мг
Тетранатрий ЭДТА	0,1 мг

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % от содержания DARPin G3-$(G_3S)_3C$, указанного на этикетке.

Описание. Белая пористая масса, в виде таблетки.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

1. **Электрофорез в полиакриламидном геле** анализ проводят в невосстанавливающих условиях (ОФС «*Электрофорез в полиакриламидном геле»*).

Молекулярную массу белка G3-$(G_3S)_3C$ определяют, сравнивая его электрофоретическую подвижность с подвижностью белков маркеров известной молекулярной массы. Полоса DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в испытуемом растворе В должна находиться на уровне ~15 кДа (раздел «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ»).

Определение проводят одним из приведенных методов.

2. **ВЭЖХ/МС** (ОФС *«Высокоэффективная жидкостная хроматография»*).

Определение молекулярной массы проводят методом ВЭЖХ с масс-детектированием.

Молекулярная масса белка G3-$(G_3S)_3$C должна составлять 14075 Да.

3. **ВЭЖХ-МС/МС** (ОФС «*Высокоэффективная жидкостная хроматография», «Масс-спектрометрия», «Пептидное картирование»*). Подлинность подтверждается перекрытием аминокислотной последовательности белка G3-$(G_3S)_3$C с идентифицированными аминокислотными последовательностями. Процент перекрытия должен составлять не менее 95 %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Определение проводят в соответствии с ОФС *«Электрофорез в полиакриламидном геле».*

Приготовление испытуемых растворов

Раствор А. Лиофилизат растворяют в 413 мкл воды очищенной при комнатной температуре в течение 10 мин, периодически перемешивая на вортексе.

Раствор Б. 100 мкл раствора А смешивают со 100 мкл воды очищенной и перемешивают.

Раствор В. 100 мкл раствора Б смешивают с 800 мкл воды очищенной и перемешивают.

В ячейки концентрирующего геля наносят 40 мкг (раствор А) и 2 мкг (раствор В) DARPin G3-$(G_3S)_3$C и смесь белков-маркеров. Электрофорез проводят при напряжении 110 В в течение 2 ч. Окраску проводят раствором Кумасси R-250 в течение 45 мин. Излишки красителя смывают раствором, содержащим 7 % ледяной уксусной кислоты, 10 % изопропанола в воде в течение 12 ч.

Молекулярную массу белка G3-$(G_3S)_3$C определяют по сравнению его подвижности с подвижностью белков-маркеров известной молекулярной массы.

На треке раствора А интенсивность полосы около 30 кДа не должна превышать интенсивности основной полосы белка на треке раствора В, что соответствует наличию примеси гомодимера не более 5 %. На треке раствора А интенсивность любых полос, помимо основной полосы белка и полосы около 30 кДа, не должна превышать 50 % от интенсивности полосы на треке раствора В, что соответствует содержанию других белковых примесей не более 2,5 %.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят в соответствии с ОФС *«Определение белка»*.

Испытуемый раствор. Лиофилизат растворяют в 2 мл фосфатного буфера (0,01 М) при комнатной температуре в течение 10 минут периодически перемешивая на вортексе.

Раствор сравнения. Фосфатный буфер 0,01 М.

Содержание DARPin G3-$(G_3S)_3C$ во флаконе рассчитывают в мг в соответствии с приведенной ниже формулой:

$$x = \frac{A}{2908 * 1} * 14075 * 2$$

где x – содержание DARPin G3-$(G_3S)_3C$ во флаконе, мг; А – измеряемая оптическая плотность; 2980 – молярный показатель поглощения, $М^{-1}*см^{-1}$; 1 – длина оптического пути или толщина слоя, см; 14075 – молярная масса DARPin G3-$(G_3S)_3C$, Да; 2 – объем испытуемого раствора, мл.

ИСПЫТАНИЯ

Бактериальные эндотоксины (ОФС «Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов»). Не более 30 ЕЭ на 1 мг белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$.

Стерильность. *(ОФС «Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов»).* Препарат должен быть стерильным.

Хранение. В соответствии с ОФС «Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов».

СПЕЦИФИКАЦИЯ

на набор для приготовления готового препарата «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения

Показатель	Методы	Нормы
1	2	3
Лиофилизат для приготовления РФЛП «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», раствор для внутривенного введения		
Описание	Визуальный	Белая пористая масса, в виде таблетки
Идентификация	Электрофорез в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях	Полоса DARPin G3-$(G_3S)_3C$ в испытуемом растворе В должна находиться на уровне ~15 кДа
	ВЭЖХ-МС	Молекулярная масса DARPin G3-$(G_3S)_3C$ должна быть 14075 Да
	ВЭЖХ-МС/МС	Перекрытие аминокислотной последовательности DARPin G3-$(G_3S)_3C$ с идентифицированными пептидными фрагментами должно составлять не менее 95 %
Количественное определение	ОФС «Определение белка», метод 1 (Спектрофотометрический)	2,97 – 3,63 мг

Определение примесей	Электрофорез в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях	На треке раствора А интенсивность полосы около 30 кДа не должна превышать интенсивности основной полосы белка на треке раствора В, что соответствует наличию примеси гомодимера не более 5 %. На треке раствора А интенсивность любых полос, помимо основной полосы белка и полосы около 30 кДа, не должна превышать 50 % от интенсивности полосы на треке раствора В, что соответствует содержанию других белковых примесей не более 2,5 %.
Бактериальные эндотоксины	ОФС «Бактериальные эндотоксины»	Не более 30 ЕЭ/мг белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$
Стерильность	ОФС «Стерильность»	Должен быть стерильным

Упаковка	ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств»	Во флаконы для лекарственных средств вместимость 10 мл. Флаконы герметично укупоривают пробками резиновыми и обжимают колпачками алюминиевыми. На флаконы наклеивают этикетки из бумаги этикеточной. В контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной, помещают 5 флаконов с лиофилизатом для приготовления раствора для внутривенного введения. Одну контурную ячейковую упаковку вместе с инструкцией по применению препарата «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc» помещают в коробку картонную или в коробку из картона марки хром-эрзац по. На коробку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной.

Маркировка	ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств»	Должна соответствовать НД.
Транспортирование	ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств»	Должен соответствовать требованиям в ОФС.
Хранение	ОФС «*Химические предшественники для радиофармацевтических лекарственных препаратов*»	В защищенном от света месте. При температуре -20 °С
Срок годности	-	2 года

Радиофармпрепарат «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», раствор для инъекций

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Стерильный раствор комплекса технеция-99м с DLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAKDEYGLPLYLATAHGHLEIVEVLLNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQKLNGGGSGGGSGGGSC ([^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$), полученный с использованием натрия пертехнетата (^{99m}Tc), раствора для инъекций

СПЕЦИФИКАЦИЯ

на готовый радиофармацевтический лекарственный препарат «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», раствор для внутривенного введения

Радиофармпрепарат «DARPin G3-$(G_3S)_3C$, ^{99m}Tc», раствор для внутривенного введения		
Описание	Визуальный	Бесцветная, прозрачная жидкость
pH	ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»	От 4,5 до 7,5
Стерильность	ОФС «Стерильность»	Должен быть стерильным
Бактериальные эндотоксины	ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»	Менее 175/V МЕ/мл, где V − максимальная рекомендуемая доза в миллилитрах.
Активность	ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»	от 90 % до 110 % от заявленной активности технеция-99м на дату и время, указанные на этикетке.
Радиохимическая чистота	ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»	Не менее 95 %

Хранение	ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»	Должно соответствовать ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»
Срок годности	-	Не более 3 ч с момента времени изготовления.

Состав на 1 флакон:

Технеций-99м в виде комплекса с DARPin G3-$(G_3S)_3C$	от 90 % до 110 % от заявленной активности технеция-99м на дату и время, указанные на этикетке.
DARPin G3-$(G_3S)_3C$	3,0 мг
Фосфор в виде ортофосфатов натрия различной степени замещения	не более 17 мг
Хлорид натрия	не более 90 мг
D-маннит	не более 0,66 мг
ПЭГ-4000	не более 0,33 мг
Хлорид олова (II)	не более 0,075 мг
Глюконат натрия	не более 5 мг
Тетранатрий ЭДТА	не более 0,1 мг

ИЗГОТОВЛЕНИЕ

В асептических условиях во флакон набора для приготовления препарата добавляют раствора натрия пертехнетата, ^{99m}Tc с активностью 500 – 700 МБк и инкубируют при 60 °С в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры.

Полученный раствор доводят до 10 мл стерильным 0,9% раствором хлорида натрия, стерилизуют фильтрацией.

Описание. Бесцветная, прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость.

pH. (ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»). От 4,5 до 7,5.

Стерильность (ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»). Должен быть стерильным. Допускается выпуск лекарственного препарата к применению до завершения испытания**.**

Бактериальные эндотоксины (ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты»). Менее 175/*V* МЕ/мл, где *V* − максимальная рекомендуемая доза (максимальный рекомендуемый объем) в миллилитрах.

РАДИОХИМИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА

Примесь А ([^{99m}Tc]пертехнетат ион). Тонкослойная хроматография (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

Испытуемый раствор. Лекарственный препарат.

Условия хроматографирования:

- *ТСХ пластинка со слоем силикагеля*, изготовленная из стекловолокна;

- *подвижная фаза:* 0,01 М фосфатный буфер;

- *наносимый объем пробы:* около 5 мкл;

- *пробег фронта подвижной фазы:* более 4/5 длины пластинки;

- *обработка зон абсорбции*: немедленное извлечение пластинки из камеры с растворителем после завершения хроматографирования;

- *детектирование:* детектор, подходящий для установления распределения активности.

Факторы удерживания (R_f): примесь В и [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3$C – 0,0 – 0,1; примесь А – 0,8-1,0.

Примесь В ([^{99m}Tc]технеций в коллоидной форме). Метод ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

Испытуемый раствор. Лекарственный препарат.

Условия хроматографирования:

- *ТСХ пластинка со слоем силикагеля*, изготовленная из стекловолокна;

- *подвижная фаза:* ацетонитрил : вода (2:3),

- *наносимый объем пробы:* около 5 мкл;

- *пробег фронта подвижной фазы:* более 4/5 длины пластинки;

- *обработка зон абсорбции*: немедленное извлечение пластинки из камеры с растворителем после завершения хроматографирования;

- *детектирование:* детектор, подходящий для установления распределения активности.

Факторы удерживания (R_f): примесь B – 0,0 – 0,1; примесь A и [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ – 0,9 – 1,0.

Предел содержания:

- [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$ не менее 95 % от общей активности, обусловленной технецием-99м.

Активность препарата, обусловленную [^{99m}Tc]Tc-DARPin G3-$(G_3S)_3C$, в процентах (X), вычисляют по формуле:

$$X = 100 – (A + B),$$

где *A* – активность, обусловленная примесью A, определенная в испытании «Примесь A», выраженная в процентах;

B – активность, обусловленная примесью B, определенная в испытании «Примесь B», выраженная в процентах.

АКТИВНОСТЬ

Определение проводят в соответствии с ОФС «Обнаружение и измерение радиоактивности».

ХРАНЕНИЕ

В соответствии с ОФС «Радиофармацевтические лекарственные препараты».

СРОК ГОДНОСТИ

Не более 3 ч после его изготовления.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблицы с полными данными по биораспределению ^{99m}Tc-комплексов с DARPin G3 с пептидными хелаторами

Таблица Б1 – Сравнительное биораспределение вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3 с пептидными хелаторами и варианта DARPin $(HE)_3$-G3, меченного радиоактивным изотопом [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$ через 4 ч после инъекции у мышей стока CD1

	[^{99m}Tc]Tc- G3-G_3C	**[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$**	**[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C**	**[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3**
Кровь	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,23 ± 0,10	0,4 ± 0,2
Слюнные железы	0,14 ± 0,02	0,33 ± 0,05	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1 [a]
Легкие	1,4 ± 0,4 [,f]	0,9 ± 0,2 [g]	1,4 ± 0,4	0,4 ± 0,1 [a ,c]
Печень	7,6 ± 1,0 [d]	6,7 ± 1,1 [g]	18,8 ± 4,2	2,4 ± 0,3 [a ,c]
Селезенка	2,2 ± 0,5 [d]	1,4 ± 0,2 [g]	5,5 ± 1,7	0,6 ± 0,1 [c]
Желудок	0,3 ± 0,1	0,33 ± 0,05	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1
Тонкий кишечник	0,2 ± 0,1	0,33 ± 0,02	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1 [a]
Почки	5,0 ± 0,5 [d]	13,3 ± 2,5 [g]	60,1 ± 13,0	143,2 ± 38,5 [a ,b, c]
Мышцы	0,2 ± 0,1	0,15 ± 0,01	0,2 ± 0,1	0,13 ± 0,06
Кости	0,9 ± 0,2 [d]	0,7 ± 0,1 [g]	2,1 ± 0,5	0,4 ± 0,1 [c]
Остаток ЖКТ*	2,4 ± 0,5	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,5
Тело*	3,4 ± 0,6	3,8 ± 0,4	5,7 ± 1,2	3,8 ± 0,6

[a] Значимое различие между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 ($p < 0,05$).

[b] Значимое различие между [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 ($p < 0,05$).

[c] Значимое различие между [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 ($p < 0,05$)

[d] Значимое различие между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и G3-E_3C-[^{99m}Tc]Tc ($p < 0,05$).

[f] Значимое различие между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и G3-$(G_3S)_3C$-[^{99m}Tc]Tc ($p < 0,05$).

[g] Значимое различие между [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C и G3-$(G_3S)_3C$-[^{99m}Tc]Tc ($p < 0,05$).

Данные представлены в качестве средних % Вд/г ± S для четырех мышей. Для выявления значимых различий между вариантами G3 был выполнен

однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным критерием сравнения Тьюки.

* Данные для остатка ЖКТ с содержимым и тела представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица Б2 – Сравнительное биораспределение [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C и варианта $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, через 4 ч после инъекции у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3, экспрессирующими HER2

	[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C		[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C		[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3	
	SKOV-3	**PC-3**	**SKOV-3**	**PC-3**	**SKOV-3**	**PC-3**
Кровь	0,2 ± 0,1	0,15 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,3 ± 0,1
Слюнные железы	0,2 ± 0,1 [a]	0,09 ± 0,02	0,33 ± 0,04 [b]	0,23 ± 0,06	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Легкие	0,35 ± 0,03 [c]	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,4 [b]	1,3 ± 0,6	0,39 ± 0,04	0,3 ± 0,1
Печень	7,2 ± 1,1 [a]	7,1 ± 0,6	6,6 ± 0,4 [b]	6,2 ± 0,6	2,8 ± 0,3	2,5 ± 0,3
Селезенка	2,0 ± 0,5 [a]	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,5 [b]	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Желудок	0,20 ± 0,03 [a]	0,18 ± 0,03	0,3 ± 0,1	0,22 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Тонкий кишечник	0,20 ± 0,08 [a]	0,15 ± 0,05	0,29 ± 0,07 [b]	0,22 ± 0,05	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Почки	8 ± 1 [a]	9 ± 1	9 ± 1 [b]	18 ± 7	163 ± 19	145 ± 13
Опухоль	2,0 ± 0,7 [d, f]	0,3 ± 0,1	3,0 ± 0,6 [e]	0,5 ± 0,2	3,7 ± 0,5 [g]	0,7 ± 0,1
Мышцы	0,2 ± 0,1	0,11 ± 0,03	0,19 ± 0,05	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Кости	0,7 ± 0,1 [c]	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Остаток ЖКТ*	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,8	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Тело*	4,1 ± 0,5	2,5 ± 0,2	4,6 ± 0,8	2,9 ± 0,3	5,4 ± 1,6	3,3 ± 0,4

[a] Различия значимые между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 для SKOV-3 ($p < 0,05$).

[b] Различия значимые между [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 для SKOV-3 ($p < 0,05$).

[c] Различия значимые между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C для SKOV-3 ($p < 0,05$).

[d] Различия значимые между между накоплением в опухоли для [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C в Nu/j мышах с SKOV-3 и PC-3 ксенотрансплантатами ($p < 0,05$).

[f] Различия значимые между между накоплением в опухоли для [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C в Nu/j мышах с SKOV-3 и PC-3 ксенотрансплантатами ($p < 0,05$).

[g] Различия значимые между накоплением в опухоли для [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 в Nu/j мышах с SKOV-3 и PC-3 ксенотрансплантатами ($p < 0,05$).

Данные представлены в качестве средних % Вд/г ± S для четырех мышей, для выявления значимых различий между вариантами G3 был выполнен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным критерием сравнения Тьюки.

* Данные для остатка ЖКТ с содержимым и тела представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица Б3 – Отношения «опухоль/орган» для вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C, [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ и варианта $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, через 4 ч после инъекции в ксенотрансплантатах SKOV-3 у мышей линии Nu/j

	[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C	**[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$**	**[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3**
Кровь	10 ± 4	15 ± 3	13 ± 2
Слюнные железы	9 ± 2	9 ± 3	7 ± 1
Легкие	6 ± 2 [a]	4 ± 1 [b]	10 ± 1
Печень	0,28 ± 0,06 [a]	0,45 ± 0,09 [b]	1,3 ± 0,3
Селезенка	1,1 ± 0,2 [a]	1,6 ± 0,4 [b]	6 ± 1
Желудок	10 ± 3	10 ± 4	8 ± 3
Тонкий кишечник	11 ± 3	11 ± 4	6 ± 1
Почки	0,25 ± 0,06 [a]	0,34 ± 0,09 [b]	0,023 ± 0,003
Мышцы	10 ± 3 [a]	16 ± 4 [b]	32 ± 7
Кости	3 ± 1 [a]	7 ± 2 [c]	8 ± 2

[a] Различия значимы между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 ($p < 0,05$).
[b] Различия значимы между [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 ($p < 0,05$).
[c] Различия значимы между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$ ($p < 0,05$).

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблицы с полными данными по биораспределению и ^{99m}Tc-радиокомплексов с DARPin G3 с HYNIC хелатором на С-конце. Электрофореграмма белков

Таблица В1 – Сравнительное биораспределение вариантов [^{99m}Tc]Tc-G3-HYNIC и варианта DARPin $(HE)_3$-G3, меченного радиоактивным изотопом [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$ через 4 часа после инъекции у мышей стока CD1

Ткань	[^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC	[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC	[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC	[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3
Кровь	0,25 ± 0,09	0,24 ± 0,02	0,28 ± 0,04	0,4 ± 0,2
Слюнные железы	1,8 ± 0,2[г]	1,2 ± 0,1[д]	3,1 ± 1,2[ж]	0,5 ± 0,1[а,б,в]
Легкие	0,6 ± 0,2[г]	0,66 ± 0,04	1,2 ± 0,1[ж]	0,4 ± 0,1[в]
Печень	6,1 ± 1,3[г]	3,9 ± 0,1[д]	20,7 ± 2,2[ж]	2,4 ± 0,3[а,б,в]
Селезенка	2,8 ± 0,3[г]	1,8 ± 0,3[д]	8,7 ± 0,6[ж]	0,6 ± 0,1[а,б,в]
Тонкий кишечник	1,2 ± 0,3[г]	0,9 ± 0,1	2,3 ± 0,3[ж]	0,4 ± 0,1[а,в]
Желудок	1,1 ± 0,2[г]	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1[ж]	0,4 ± 0,1[а,б,в]
Почки	42,6 ± 3,3[г]	13,6 ± 2,9	111 ± 16[ж]	143 ± 39[а,б]
Мышцы	0,23 ± 0,03[г]	0,27 ± 0,03	0,45 ± 0,05[ж]	0,13 ± 0,06[б,в]
Кости	1,3 ± 0,2[г]	0,9 ± 0,2	3,1 ± 0,6[ж]	0,4 ± 0,1[а,б]
Остаток ЖКТ*	3,0 ± 0,6	3,3 ± 1,0	3,9 ± 0,5	1,8 ± 0,5
Тело*	6,7 ± 1,1	6,2 ± 0,8	12 ± 1	3,8 ± 0,6

[а] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3.

[б] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3.

[в] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3.

[г] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]T-G3-E_3C-HYNIC.

[д] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-G_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC.

[ж] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC.

Данные представлены в качестве средних % Вд/г ± S для четырех мышей. Для выявления значимых различий между вариантами G3 был выполнен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным критерием сравнения Тьюки.

* Данные для остатка ЖКТ с содержимым и тела представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица В2 – Сравнительное биораспределение [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и варианта $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, через 4 часа после инъекции у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3, экспрессирующими HER2

Ткань	[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC		[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3	
	SKOV-3	PC-3	SKOV-3	PC-3
Кровь	0,9 ± 0,1[а]	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,1
Слюнные железы	0,81 ±0,02[а]	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Легкие	0,69 ± 0,05[а]	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,1

Продолжение таблицы В2

Ткань	[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC		[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3	
Печень	4,2 ± 0,6[а]	4,0 ± 0,4	2,8 ± 0,3	2,5 ±0,3
Селезенка	0,9 ± 0,1[а]	0,86 ± 0,04	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Тонкий кишечник	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Желудок	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Почки	173 ± 21	173 ± 22	163 ± 19	145 ± 13
Опухоль	3,1 ± 1,1[б]	0,8 ± 0,3	3,7 ± 0,5[в]	0,7 ± 0,1
Мышцы	0,3 ± 0,1[а]	0,3 ± 0,1	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Кости	0,7 ± 0,1[а]	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Остаток ЖКТ*	1,2 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Тело*	9,5 ± 2,1	0,8 ± 0,7	5,4 ± 1,6	3,3 ± 0,4

[а] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 для ксенотрансплантатов SKOV-3 (непарный t-тест).

[б] Значимое различие ($p < 0,05$) в накоплении в опухоли для [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G^3S)_3$C-HYNIC у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3, экспрессирующими HER2 (непарный t-тест).

[в] Значимое различие ($p < 0,05$) в накоплении в опухоли для [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 у мышей линии Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и PC-3, экспрессирующими HER2 (непарный t-тест).

Данные представлены в качестве средних значений %ВД/г ± S для четырех мышей.

* Данные для остатка ЖКТ с содержимым и тела представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица В3 – Отношения «опухоль/орган» для [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и варианта $(HE)_3$-G3, меченного [^{99m}Tc]Tc$(CO)_3$, у мышей линии Nu/J с ксенотрансплантатами SKOV-3 через 4 ч после инъекции. Данные представлены в качестве средних значений ± S для четырех мышей

Ткань	[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC	[^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3
Кровь	10 ± 6	13 ± 2
Слюнные железы	6 ± 4	7 ± 1
Легкие	6 ± 2[a]	10 ± 1
Печень	0,8 ± 0,2[a]	1,3 ± 0,3
Селезенка	4 ± 1[a]	6 ± 1
Тонкий кишечник	7 ± 4[a]	8 ± 3
Желудок	8 ± 5	6 ± 1
Почки	0,023 ± 0,009	0,023 ± 0,003
Мышцы	19 ± 13	32 ± 7
Кости	5 ± 2	8 ± 2

[a] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-$(HE)_3$-G3 для ксенотрансплантатов SKOV-3 (непарный t-тест).

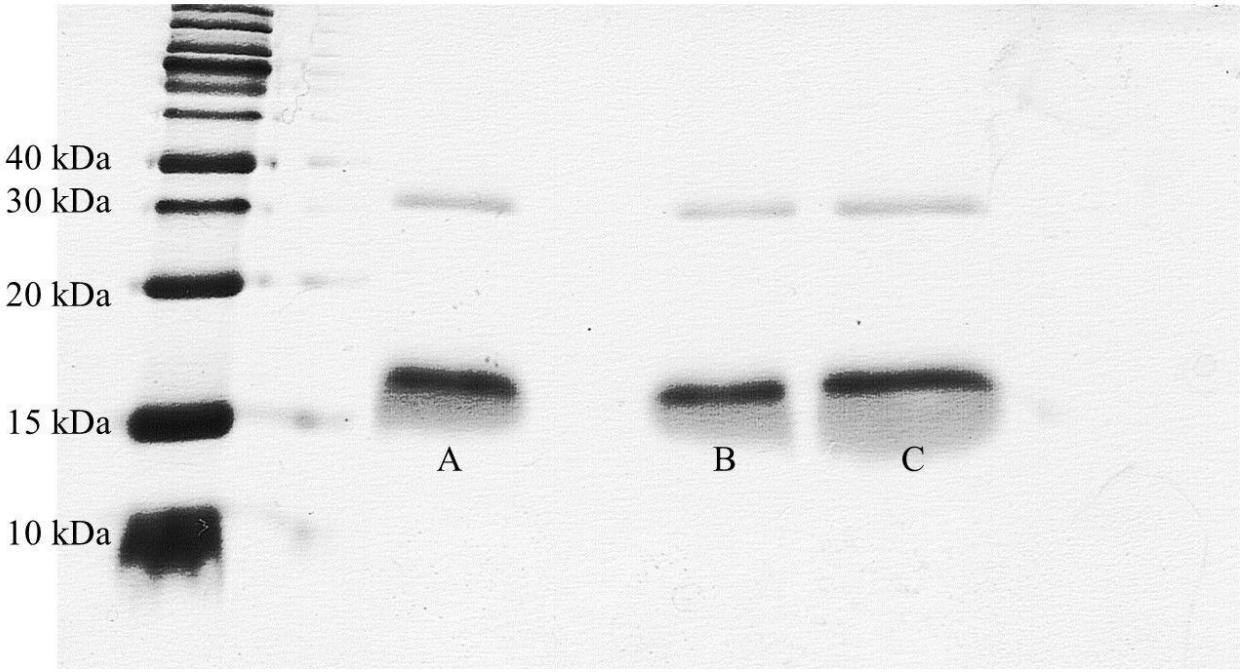


Рисунок В1 – Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия очищенного HYNIC-DARPin-G3 (A – G3-G_3C-HYNIC, B – G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC, C – G3-E_3C-HYNIC).

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблицы с полными данными по биораспределению 99mTc-комплексов с DARPin G3 с HYNIC-хелаторами на N-конце. Электрофореграмма белков

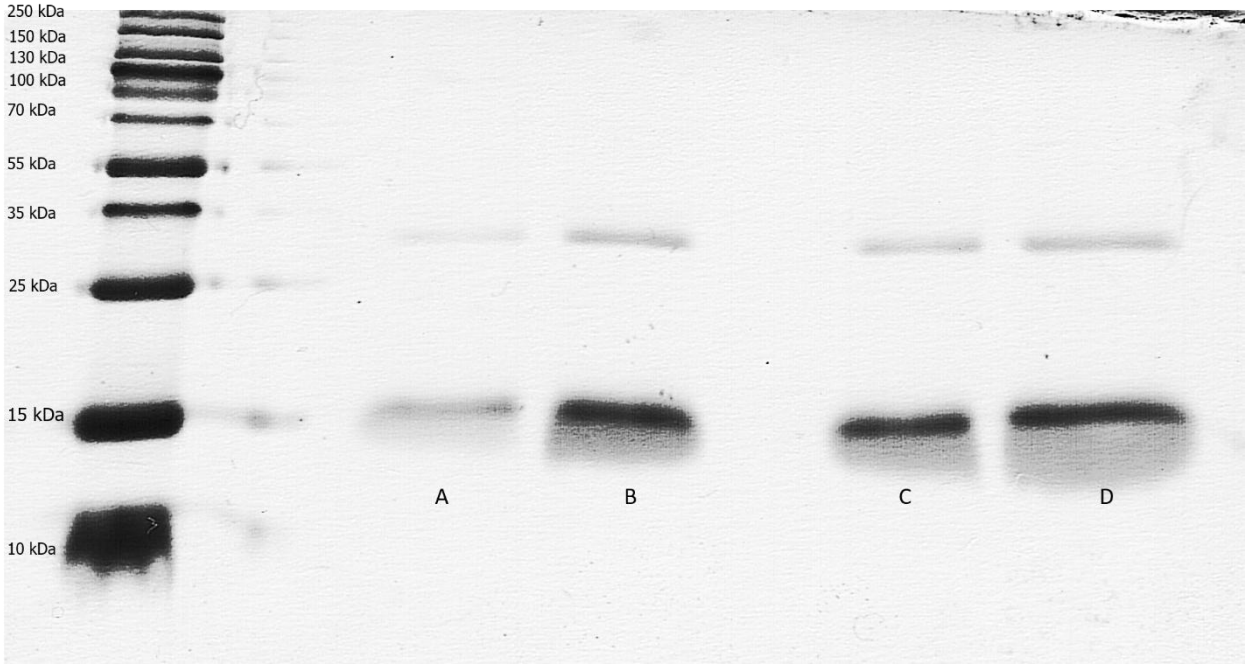


Рисунок Г1 – Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия очищенных белков DARPin G3-HYNIC: (A) HYNIC-CE_3-G3, (B) HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3, (C) G3-E_3C-HYNIC и (D) G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC

Таблица Г1 – Сравнительное биораспределение меченных [^{99m}Tc]Tc вариантов HYNIC-G3 через 4 часа после инъекции у мышей CD1

	[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3	[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3	[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC	[^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC
Кровь	0,33 ± 0,05	0,4 ± 0,2	0,23 ± 0,09	0,42 ± 0,04
Слюнные железы	0,70 ± 0,10	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,55 ± 0,05
Легкие	0,6 ± 0,1 [а,б]	0,6 ± 0,1 [в,г]	1,8 ± 0,2	1,68 ± 0,27
Печень	3,6 ± 0,4 [а,б]	3,1 ± 0,3 [в,г]	17,2 ± 0,8[д]	12,75 ± 1,57
Селезенка	1,1 ± 0,2 [а,б]	1,3 ± 0,2 [в,г]	5,7 ± 1,1[д]	3,81 ± 1,2
Желудок	1,3 ± 0,9	0,9 ± 0,4	0,7 ± 0,2	0,66 ± 0,38
Тонкий кишечник	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,6
Почки	244 ± 14 [а,б]	262 ± 15 [в,г]	172 ± 13	174 ± 8
Мышцы	0,32 ± 0,06	0,30 ± 0,04	0,33 ± 0,06	0,38 ± 0,08
Кости	1,9 ± 0,2 [а]	1,6 ± 0,4 [с]	2,9 ± 0,4[д]	1,93 ± 0,32
Остаток ЖКТ*	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,31 ± 0,19
Тело*	6,4 ± 0,7	4,9 ± 0,4	7,6 ± 0,1	6,83 ± 0,67

[а] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC;

[б] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC;

[в] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC;

[г] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C$(G_3S)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC;

[д] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC,

Данные представлены в качестве средних % Вд/г ± S для четырех мышей, для выявления значимых различий между вариантами G3 был выполнен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным критерием сравнения Тьюки.

* Данные для остатка ЖКТ с содержимым и тела представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица Г2 – Сравнительное биораспределение меченных [^{99m}Tc]Tc вариантов HYNIC-G3 через 4 часа после инъекции у мышей Nu/j с ксенотрансплантатами SKOV-3 и Ramos

	[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE$_3$-G3		[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G$_3$S)$_3$-G3		[^{99m}Tc]Tc-G3-(G$_3$S)$_3$C-HYNIC
	SKOV-3	Ramos	SKOV-3	Ramos	SKOV-3
Кровь	0,76 ± 0,06 [а,б,в]	1,05 ± 0,1 [г,ж,з]	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,34 ± 0,11
Слюнные железы	1,2 ± 0,13 [а,б,в]	1,51 ± 0,36 [г,ж,з]	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,45 ± 0,04
Легкие	1,1 ± 0,09 [а,б]	1,05 ± 0,17 [г,ж]	0,5 ± 0,1 [к]	0,6 ± 0,1 [л]	1,37 ± 0,37
Печень	12,2 ± 1,37 [а,б]	13,13 ± 1,73 [г,ж,з]	5,1 ± 0,4 [к]	6,0 ± 0,1 [л]	13,63 ± 0,35
Селезенка	2 ± 0,14 [а,б]	2,63 ± 0,18 [г,д,ж]	0,9 ± 0,2 [к]	1 ± 0,1 [л]	2,37 ± 0,15
Желудок	1,1 ± 0,31	1,31 ± 0,42 [з]	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,52 ± 0,10
Тонкий кишечник	1,4 ± 0,55	1,61 ± 0,73	0,7 ± 0,4	1 ± 0,4	0,58 ± 0,25
Почки	215 ± 2	221 ± 72	195 ± 7	235 ± 27	154 ± 13
Опухоль	4,37 ± 0,83	0,58 ± 0,23	4,9 ± 0,5	0,5 ± 0,5	4,51 ± 0,35
Мышцы	0,35 ± 0,03	0,46 ± 0,09 [г,ж,з]	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,21 ± 0,03
Кости	2,22 ± 0,12 [а,б]	2,11 ± 0,49 [г,ж]	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,68 ± 0,45
Остаток ЖКТ*	2,1 ± 0,2	2,46 ± 0,91	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,40 ± 0,74
Тело*	10,6 ± 0,6	13,0 ± 3,4	6,4 ± 0,4	5,1 ± 0,6	6,6 ± 0,8

[а] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE$_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-C(G$_3$S)$_3$-G3 для ксенотрансплантатов SKOV-3;

[б] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 с ксенотрансплантатами SKOV-3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 с ксенотрансплантатами Ramos;

[в] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC для ксенотрансплантатов SKOV-3;

[г] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 с ксенотрансплантатами Ramos и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 и с ксенотрансплантатами SKOV-3;

[д] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 с ксенотрансплантатами SKOV-3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 с ксенотрансплантатами Ramos;

[ж] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 для ксенотрансплантатов Ramos;

[з] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 с ксенотрансплантатами Ramos и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC с ксенотрансплантатами SKOV-3;

[к] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC для ксенотрансплантатов SKOV-3;

[л] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 с ксенотрансплантатами Ramos и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3$C-HYNIC с ксенотрансплантатами SKOV-3.

Данные представлены в качестве средних % Вд/г ± S для четырех мышей, для выявления значимых различий между вариантами G3 был выполнен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным критерием сравнения Тьюки.

* Данные для остатка ЖКТ с содержимым и тела представлены в виде % ВД на весь образец.

Таблица Г3 – Отношения «опухоль/орган» меченных [^{99m}Tc]Tc вариантов G3-HYNIC через 4 ч после инъекции в ксенотрансплантатах SKOV-3 у мышей линии Nu/j

	[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3	[^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3	[^{99m}Tc]Tc-G3-E_3C-HYNIC
Кровь	5,75 ± 1,11[а]	12,11 ± 3,92	14,07 ± 4,61
Слюнные железы	3,59 ± 0,73[а,б]	8,45 ± 2,13	10,04 ± 1,68
Легкие	4,13 ± 0,92[б]	9,23 ± 1,30[с]	3,40 ± 0,65
Печень	0,37 ± 0,10[б]	0,98 ± 0,16[с]	0,33 ± 0,02
Селезенка	2,16 ± 0,51[б]	5,30 ± 0,58[с]	1,91 ± 0,26
Желудок	4,12 ± 0,63[а]	6,46 ± 0,65	8,99 ± 2,22
Тонкий кишечник	3,34 ± 0,94	7,97 ± 3,72	8,58 ± 2,98
Почки	0,020 ± 0,001[а]	0,030 ± 0,001	0,030 ± 0,001
Мышцы	12,60 ± 2,49	23,83 ± 9,65	21,54 ± 3,97
Кости	1,96 ± 0,32[б]	5,06 ± 0,52[с]	2,86 ± 0,97

[а] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC;

[б] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-CE_3-G3 и [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3;

[в] Значимое различие ($p < 0,05$) между [^{99m}Tc]Tc-HYNIC-$C(G_3S)_3$-G3 и [^{99m}Tc]Tc-G3-$(G_3S)_3C$-HYNIC.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Графические результаты ВЭЖХ/МС/МС анализа белков

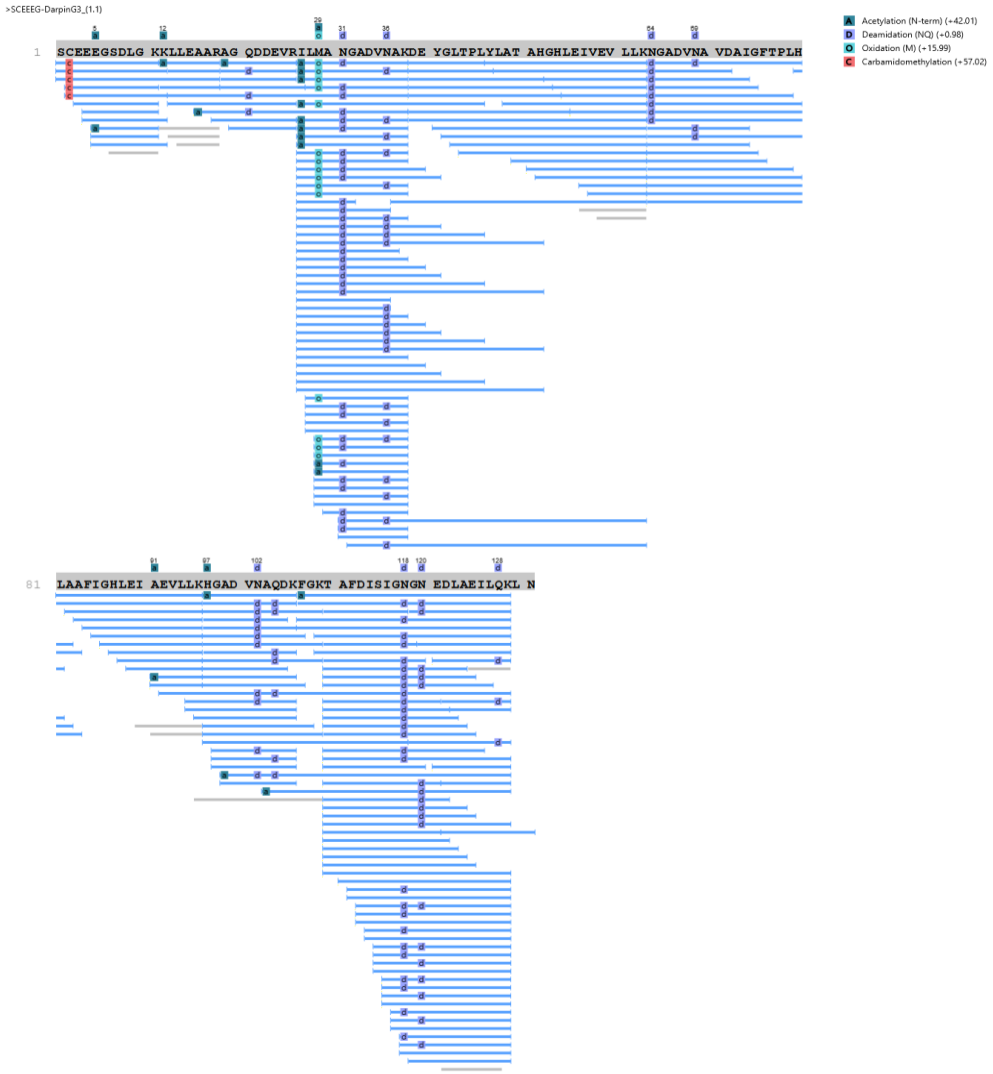


Рисунок Д1 – Карта перекрытия последовательности белка E3C-G3 пептидами, идентифицированными с помощью МС/МС. Аминокислотная последовательность E3C-G3 представлена в стандартном однобуквенном коде IUPAC. Экспериментально идентифицированные пептидные фрагменты нанесены на соответствующие участки последовательности. Посттрансляционные модификации, обнаруженные при масс-спектрометрическом анализе, отмечены цветными маркерами: красные квадраты – карбамидометилированный цистеин (C), фиолетовые квадраты – дезамидированные аспарагин/глутамин (D), зеленые квадраты – окисленный метионин (O), темно-зеленые квадраты – ацетилированные остатки (A)

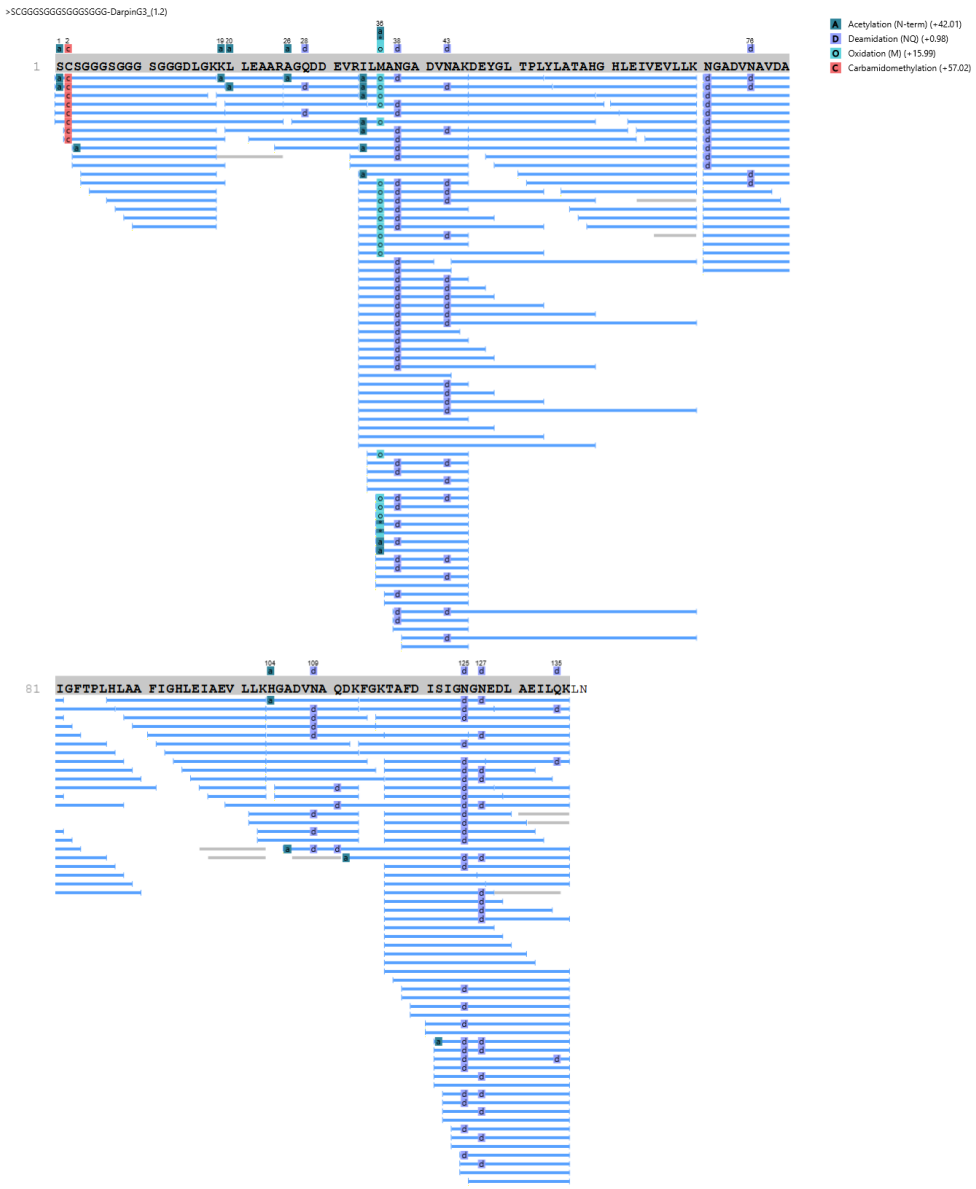


Рисунок Д2 – Карта перекрытия последовательности белка $C(G_3S)_3$-G3 пептидами, идентифицированными с помощью МС/МС. Аминокислотная последовательность $C(G_3S)_3$-G3 представлена в стандартном однобуквенном коде IUPAC. Экспериментально идентифицированные пептидные фрагменты нанесены на соответствующие участки последовательности. Посттрансляционные модификации, обнаруженные при масс-спектрометрическом анализе, отмечены цветными маркерами: красные квадраты – карбамидометилированный цистеин (C), фиолетовые квадраты – дезамидированные аспарагин/глутамин (D), зеленые квадраты – окисленный метионин (O), темно-зеленые квадраты – ацетилированные остатки (A)

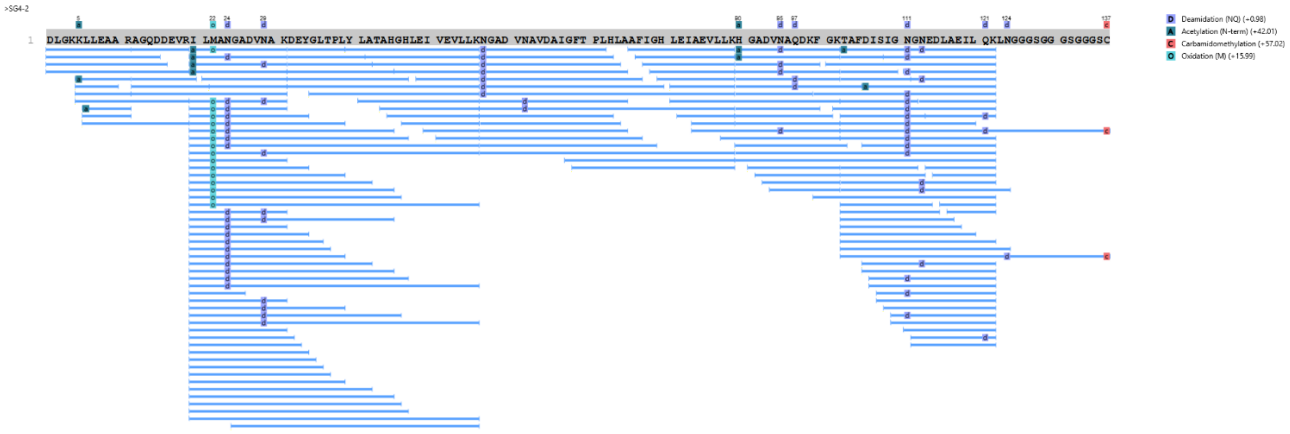


Рисунок Д3 – Перекрытие аминокислотной последовательности белка DARPin G3-$(G_3S)_3C$ идентифицированными пептидными фрагментами. Аминокислоты обозначены в соответствии с номенклатурой ИЮПАК (приведены буквенные обозначения). Аминокислоты, подвергающие модификацией в процессе анализа обозначены красные квадраты – карбамидометилированный цистеин (C), фиолетовые квадраты – дезамидированные аспарагин/глутамин (D), зеленые квадраты – окисленный метионин (O), темно-зеленые квадраты – ацетилированные остатки (A)

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Результаты исследования острой токсичности

Таблица Е1 – Данные клинического осмотра мышей после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc

Срок исследования	Группа 1 (n=10)	Группа 2 (n=10)	Группа 3 (n=10)	Группа 4 (n=10)	Группа 5 (n=10)	Группа 6 (n=10)	Группа 7 (n=10)	Группа 8 (n=10)
До введения	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 5 минут	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 15 минут	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 30 минут	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 1 час	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 4 час	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 24 час	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 7 дней	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 14 дней	N	N	N	N	N	N	N	N

Примечание: N – норма, нет значимых клинических проявлений

Таблица Е2 – Общая масса (г) и прирост массы тела (%) мышей после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

	Масса тела			Прирост массы	
Группа	До введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения
самцы					
Группа 1 (n=5) Контроль	27,52±0,50	31,04±0,79	32,28±0,54	12,79±2,02	17,32±0,69
Группа 2 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	27,52±0,33	30,80±0,69	31,50±0,73	11,91±1,98	14,43±1,83
Группа 3 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,2 мл	27,54±0,40	30,10±0,42	31,78±0,58	9,31±0,86	15,42±1,80
Группа 4 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,05 мл	27,46±0,55	30,24±0,49	32,62±0,39	10,21±1,73	18,92±2,08
самки					
Группа 1 (n=5) Контроль	20,88±0,57	23,62±0,87	24,92±0,94	13,22±3,68	19,51±4,42
Группа 2 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	19,96±0,44	22,80±1,15	24,90±1,58	14,00±3,97	24,42±6,35
Группа 3 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,2 мл	20,28±0,29	22,94±0,62	24,70±0,61	13,08±2,22	21,79±2,46
Группа 4 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,05 мл	20,08±0,46	22,48±0,65	25,30±0,45	11,89±1,02	26,11±2,00

Таблица Е3 – Общая масса (г) и прирост массы тела (%) мышей после однократного внутрибрюшинного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

	Масса тела			Прирост массы	
Группа	До введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения
самцы					
Группа 5 (n=5) Контроль	27,86±0,60	31,26±0,78	31,74±0,76	12,21±1,37	13,93±1,24
Группа 6 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 1 мл	26,86±1,19	29,26±0,99	30,94±0,95	9,18±1,91	15,54±2,44
Группа 7 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, 0,5 мл	27,00±0,67	29,38±0,80	31,56±0,57	8,84±1,64	17,01±1,72
Группа 8 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,1 мл	27,30±0,32	29,68±0,30	31,50±0,44	8,76±1,40	15,41±1,53
самки					
Группа 5 (n=5) Контроль	20,58±0,54	23,08±1,07	24,06±1,24	12,14±4,19	16,92±5,28
Группа 6 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 1 мл	20,58±0,41	23,78±1,06	25,36±0,83	15,68±5,26	23,46±4,94
Группа 7 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	20,14±0,57	21,70±0,62	24,38±0,63	7,80±1,83	21,28±3,48
Группа 8 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,1 мл	20,10±0,45	22,14±0,56	24,52±0,74	10,12±0,56	21,94±1,89

Таблица Е4 – Температура тела мышей (°С) после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Группа	До введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения
самцы			
Группа 1 (n=5) Контроль	38,8±0,2	38,5±0,2	38,5±0,3
Группа 2 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	38,6±0,1	38,7±0,3	38,6±0,3
Группа 3 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, 0,2 мл	38,7±0,3	38,6±0,3	38,3±0,3
Группа 4 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,05 мл	38,6±0,2	38,5±0,3	38,3±0,2
самки			
Группа 1 (n=5) Контроль	38,6±0,3	38,6±0,2	38,7±0,3
Группа 2 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	38,8±0,1	38,6±0,2	38,9±0,3
Группа 3 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,2 мл	38,8±0,2	38,7±0,2	38,9±0,3
Группа 4 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,05 мл	38,6±0,3	38,9±0,3	38,8±0,3

Таблица Е5 – Температура тела мышей (°С) после однократного внутрибрюшинного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Группа	До введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения
самцы			
Группа 5 (n=5) Контроль	38,7±0,2	38,6±0,3	38,7±0,3
Группа 6 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 1 мл	38,6±0,3	38,6±0,3	38,8±0,3
Группа 7 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, 0,5 мл	38,7±0,3	38,7±0,3	38,7±0,3
Группа 8 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,1 мл	38,7±0,2	38,4±0,3	38,4±0,3
самки			
Группа 5 (n=5) Контроль	38,8±0,2	38,5±0,3	38,5±0,2
Группа 6 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 1 мл	38,4±0,2	38,5±0,3	38,6±0,3
Группа 7 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	38,7±0,2	38,7±0,2	38,4±0,3
Группа 8 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,1 мл	38,4±0,3	38,5±0,3	38,6±0,2

Таблица Е6 – Данные клинического осмотра крыс после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc

Срок исследования	Группа 1 (n=10)	Группа 2 (n=10)	Группа 3 (n=10)	Группа 4 (n=10)	Группа 5 (n=10)	Группа 6 (n=10)	Группа 7 (n=10)	Группа 8 (n=10)
До введения	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 5 минут	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 15 минут	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 30 минут	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 1 час	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 4 час	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 24 час	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 7 дней	N	N	N	N	N	N	N	N
Через 14 дней	N	N	N	N	N	N	N	N

Примечание: N – норма, нет значимых клинических проявлений

Таблица Е7 – Общая масса (г) и прирост массы тела крыс (%) после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±S

	Масса тела			Прирост массы	
Группа	До введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения
самцы					
Группа 1 (n=5) Контроль	220,80±7,91	245,60±14,35	271,20±15,08	10,93±3,68	22,50±3,30
Группа 2 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 2 мл	214,00±14,25	242,80±16,79	275,40±14,39	13,38±1,29	29,27±3,26
Группа 3 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	220,60±7,62	233,80±6,18	271,20±15,08	6,11±1,06	24,03±9,42
Группа 4 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,2 мл	217,00±5,66	243,40±9,78	275,40±14,39	12,42±5,00	27,29±7,40
самки					
Группа 1 (n=5) Контроль	178,60±9,60	183,20±7,19	202,20±8,98	2,95±2,18	13,85±5,12
Группа 2 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 2 мл	179,60±8,78	184,20±9,42	201,00±11,49	2,53±0,89	12,03±4,56
Группа 3 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	176,00±7,50	182,00±7,42	191,80±7,72	3,45±0,62	9,10±2,11
Группа 4 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,2 мл	179,40±6,65	187,60±6,73	200,60±7,45	4,59±0,55	11,87±1,97

Таблица Е8 – Общая масса (г) и прирост массы тела (%) крыс после однократного внутрибрюшинного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

	Масса тела			Прирост массы	
Группа	До введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения
самцы					
Группа 5 (n=5) Контроль	203,00±8,04	240,40±7,76	268,40±7,44	18,76±3,61	32,77±4,97
Группа 6 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 5 мл	210,00±8,12	249,60±5,71	279,40±5,52	19,21±2,57	33,82±5,74
Группа 7 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 2 мл	204,80±9,62	232,20±9,49	264,40±9,15	13,60±2,31	29,40±1,76
Группа 8 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	203,60±4,06	232,20±4,02	262,00±6,91	14,12±1,59	28,62±0,90
самки					
Группа 5 (n=5) Контроль	179,40±6,45	186,40±7,92	195,40±11,29	3,81±1,01	8,61±2,71
Группа 6 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 2 мл	184,20±5,82	191,40±5,39	206,40±8,48	3,96±0,77	12,01±2,29
Группа 7 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	187,40±4,70	195,60±4,72	209,00±5,10	4,39±0,68	11,56±1,26
Группа 8 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,2 мл	189,80±5,11	199,40±5,60	205,80±5,09	5,06±0,75	8,49±1,43

Таблица Е9 – Температура тела крыс (°С) после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Группа	До введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения
самцы			
Группа 1 (n=5) Контроль	38,8±0,3	38,6±0,3	38,6±0,2
Группа 2 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 2 мл	38,5±0,3	38,6±0,3	38,4±0,2
Группа 3 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, 0,5 мл	38,8±0,3	38,6±0,3	38,5±0,3
Группа 4 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,2 мл	38,5±0,3	38,7±0,2	38,7±0,3
самки			
Группа 1 (n=5) Контроль	38,8±0,2	38,6±0,3	38,7±0,3
Группа 2 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 2 мл	38,7±0,3	38,6±0,3	38,5±0,3
Группа 3 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	38,8±0,3	38,3±0,3	38,6±0,2
Группа 4 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,2 мл	38,5±0,3	38,8±0,3	38,8±0,3

Таблица Е10 – Температура тела крыс (°С) после однократного внутрибрюшинного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Группа	До введения	Через 7 дней после введения	Через 14 дней после введения
самцы			
Группа 5 (n=5) Контроль	38,6±0,2	38,6±0,2	38,7±0,2
Группа 6 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 5 мл	38,7±0,2	38,7±0,2	38,7±0,2
Группа 7 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 2 мл	38,6±0,2	38,6±0,2	38,6±0,2
Группа 8 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	38,8±0,2	38,7±0,2	38,5±0,2
самки			
Группа 5 (n=5) Контроль	38,5±0,3	38,7±0,2	38,4±0,3
Группа 6 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 5 мл	38,4±0,3	38,6±0,3	38,5±0,3
Группа 7 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 2 мл	38,5±0,3	38,6±0,4	38,6±0,2
Группа 8 (n=5) Радиофармпрепарат, меченый радионуклидом ^{99m}Tc, доза 0,5 мл	38,6±0,3	38,7±0,2	38,5±0,3

Таблица Е11 – Масса внутренних органов (г) мышей после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Показатели	Самцы		Самки	
	Контроль (Группа 1)	Опыт (Группа 2)	Контроль (Группа 1)	Опыт (Группа 2)
Головной мозг	0,49±0,01	0,50±0,01	0,48±0,01	0,50±0,01
Тимус	0,05±0,00	0,05±0,00	0,08±0,01	0,07±0,01
Сердце	0,18±0,01	0,17±0,02	0,13±0,00	0,13±0,01
Печень	1,97±0,05	1,98±0,15	1,53±0,06	1,56±0,17
Селезенка	0,10±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01	0,11±0,01
Почки	0,53±0,03	0,49±0,03	0,35±0,01	0,37±0,04
Надпочечники	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
Семенники/яичники	0,20±0,01	0,20±0,01	0,03±0,00	0,03±0,01
Общая масса	32,28±0,54	31,50±0,73	24,92±0,94	24,90±1,58

Таблица Е12 – Коэффициент массы (%) внутренних органов мышей после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Показатели	Самцы		Самки	
	Контроль (Группа 1)	Опыт (Группа 2)	Контроль (Группа 1)	Опыт (Группа 2)
Головной мозг	1,53±0,04	1,59±0,06	1,92±0,06	2,03±0,15
Тимус	0,16±0,01	0,15±0,02	0,31±0,05	0,29±0,03
Сердце	0,55±0,03	0,55±0,05	0,52±0,02	0,54±0,02
Печень	6,09±0,06	6,28±0,46	6,15±0,21	6,21±0,43
Селезенка	0,30±0,02	0,35±0,02	0,42±0,03	0,45±0,03
Почки	1,63±0,09	1,55±0,11	1,42±0,05	1,43±0,06
Надпочечники	0,06±0,01	0,05±0,01	0,07±0,00	0,07±0,01
Семенники/яичники	0,63±0,05	0,64±0,01	0,12±0,02	0,12±0,02

Таблица Е13 – Масса внутренних органов (г) мышей после однократного внутрибрюшинного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Показатели	Самцы		Самки	
	Контроль (Группа 5)	Опыт (Группа 6)	Контроль (Группа 5)	Опыт (Группа 6)
Головной мозг	0,49±0,01	0,50±0,01	0,47±0,02	0,49±0,01
Тимус	0,05±0,01	0,06±0,00	0,06±0,01	0,06±0,01
Сердце	0,16±0,01	0,17±0,01	0,13±0,01	0,15±0,01
Печень	1,98±0,10	2,00±0,09	1,43±0,12	1,60±0,08
Селезенка	0,11±0,00	0,12±0,01	0,10±0,01	0,11±0,01
Почки	0,54±0,04	0,54±0,02	0,36±0,02	0,39±0,00
Надпочечники	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
Семенники/яичники	0,19±0,01	0,19±0,01	0,03±0,00	0,03±0,00
Общая масса	31,74±0,76	30,94±0,95	24,06±1,24	25,36±0,83

Таблица Е14 – Коэффициент массы (%) внутренних органов мышей после однократного внутрибрюшинного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Показатели	Самцы		Самки	
	Контроль (Группа 5)	Опыт (Группа 6)	Контроль (Группа 5)	Опыт (Группа 6)
Головной мозг	1,55±0,06	1,61±0,06	1,96±0,08	1,95±0,05
Тимус	0,16±0,02	0,18±0,01	0,23±0,03	0,22±0,02
Сердце	0,51±0,03	0,54±0,02	0,53±0,06	0,58±0,02
Печень	6,22±0,24	6,47±0,31	5,91±0,27	6,31±0,15
Селезенка	0,34±0,02	0,38±0,03	0,43±0,04	0,45±0,04
Почки	1,69±0,11	1,76±0,10	1,51±0,05	1,53±0,06
Надпочечники	0,05±0,01	0,05±0,00	0,06±0,01	0,07±0,01
Семенники/яичники	0,58±0,04	0,60±0,02	0,14±0,01	0,12±0,02

Таблица Е15 – Масса внутренних органов (г) крыс после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, среднее значение ± S

Показатели	Самцы		Самки	
	Контроль (Группа 1)	Опыт (Группа 2)	Контроль (Группа 1)	Опыт (Группа 2)
Головной мозг	1,69±0,02	1,68±0,01	1,67±0,04	1,59±0,05
Тимус	0,44±0,06	0,55±0,05	0,50±0,04	0,43±0,04
Сердце	1,22±0,07	1,30±0,07	0,95±0,04	0,92±0,05
Печень	13,08±0,89	14,35±0,51	9,21±0,58	8,79±0,45
Селезенка	0,79±0,04	0,73±0,03	0,73±0,05	0,70±0,05
Почки	2,32±0,15	2,39±0,05	1,69±0,07	1,59±0,05
Надпочечники	0,06±0,00	0,06±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01
Семенники/яичники	3,54±0,09	3,60±0,07	0,14±0,01	0,13±0,01
Общая масса	271,20±15,08	275,40±14,39	202,20±8,98	201,00±11,49

Таблица Е16 – Коэффициент массы (%) внутренних органов крыс после однократного внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Показатели	Самцы		Самки	
	Контроль (Группа 1)	Опыт (Группа 2)	Контроль (Группа 1)	Опыт (Группа 2)
Головной мозг	0,63±0,04	0,62±0,03	0,83±0,04	0,83±0,04
Тимус	0,16±0,02	0,20±0,02	0,25±0,02	0,21±0,01
Сердце	0,45±0,01	0,48±0,04	0,47±0,01	0,46±0,02
Печень	4,82±0,14	5,27±0,33	4,54±0,11	4,38±0,07
Селезенка	0,26±0,01	0,27±0,01	0,36±0,02	0,35±0,01
Почки	0,86±0,02	0,88±0,04	0,84±0,01	0,80±0,02
Надпочечники	0,02±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
Семенники/яичники	1,32±0,09	1,33±0,10	0,07±0,00	0,06±0,01

Таблица Е17 – Масса внутренних органов (г) крыс после однократного внутрибрюшинного введения радиофармацевтического лекарственного препарата, на основе DARPin, тропного к HER2, меченого радионуклидом ^{99m}Tc, X±m

Показатели	Самцы		Самки	
	Контроль (Группа 5)	Опыт (Группа 6)	Контроль (Группа 5)	Опыт (Группа 6)
Головной мозг	1,68±0,01	1,66±0,03	1,60±0,05	1,61±0,03
Тимус	0,51±0,01	0,52±0,03	0,35±0,03	0,39±0,05
Сердце	1,16±0,04	1,01±0,18	0,91±0,05	0,91±0,07
Печень	12,89±0,30	13,70±0,79	9,23±0,60	9,31±0,57
Селезенка	0,72±0,04	0,76±0,02	0,71±0,08	0,65±0,02
Почки	2,38±0,07	2,39±0,07	1,64±0,07	1,67±0,06
Надпочечники	0,06±0,01	0,06±0,01	0,07±0,00	0,07±0,01
Семенники/яичники	3,28±0,06	3,48±0,04	0,14±0,01	0,14±0,01
Общая масса	268,40±7,44	279,40±5,52	195,40±11,29	206,40±8,48

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Протокол определения БЭ

2.1.1.1 Подтверждение заявленной чувствительности лизата амебоцитов серии 22061139 (таблица Ж1).

Таблица Ж1 – Чувствительность ЛАЛ-реактива λ=0,03 ЕЭ/мл. Дата контроля 19.10.2024

Разведение стандарта эндотоксина	2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	Отрицательный контроль
Результаты	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- -

Определенная чувствительность составила 0,03 ЕЭ/мл.

2.1.1.2 Количественное определении БЭ в препарате серии ^{99m}*Tc-DARPin G3* (таблица Ж2).

Таблица Ж2 – Количественное определении БЭ в препарате

По вторности	Разведение образца препарата (**раствор А**)									Конечная точка реакции	Log $_{10\ e}$	Среднее значение Log10e	Разведение в конечной точке Log $_{10\text{-}1}$	Опре-ная концация эндсина, ЕЭ/мл*
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024				
1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1/256	-2,408	-2,2575	0,0055 (1:181)	***5,43***
2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1/128	- 2,107			

*Концентрация эндотоксина = чувствительность ЛАЛ –реактива * разведение в конечной точки.

2.1.1.3 Положительный контроль испытуемого образца представлен в таблице Ж3.

Таблица Ж3 – Положительный контроль испытуемого образца

Испытуемое лекарственное средство в крайнем разведении + контрольный стандарт эндотоксина в концентрации 2λ (**раствор В**)	**Результаты**
Препарат (1:2)+ КСЭ (2λ)	- -
Препарат (1:4)+ КСЭ (2λ)	- -
Препарат (1:8)+ КСЭ (2λ)	+ +
Препарат (1:16)+ КСЭ (2λ)	+ +
Препарат (1:32)+ КСЭ (2λ)	+ +
Препарат (1:64)+ КСЭ (2λ)	+ +

Препарат (1:128)+ КСЭ (2λ)	+ +
Препарат (1:256)+ КСЭ (2λ)	+ +
Препарат (1:512)+ КСЭ (2λ)	+ +
Препарат (1:1024)+ КСЭ (2λ)	+ +

2.1.1.4 Контроль чувствительности ЛАЛ реактива и отрицательный контроль представлены в таблице Ж4

Таблица Ж4 – Контроль чувствительности ЛАЛ реактива и отрицательный контроль

Разведение контрольного стандарта эндотоксина - КСЭ (раствор С)	2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	Отрицательный контроль (Раствор D)
Результаты	+ +	+ +	- -	- -	- -

Тест достоверен. Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива подтверждена. Отрицательный контроль (раствор D) - получены отрицательные результаты в двух повторностях.

Положительный контроль испытуемого образца в различных разведениях (раствор В) - получены положительные результаты в двух повторностях во всех разведениях (ингибирование в данных разведениях отсутствует).

Положительный контроль разведения КСЭ (раствор С) – среднее геометрическое значение концентрации бактериальных эндотоксинов составляет не менее 0,5λ и не более 2λ.

Для раствора А конечной точкой реакции является положительный результат, полученный для наибольшего разведения. Определенная в анализе концентрация эндотоксина образца препарата серии *G3(G3S)3C* составила *5,43* ЕЭ/мл. Образец ПРОШЕЛ ИСПЫТАНИЯ на содержания БЭ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Акт внедрения результатов диссертационной работы

«УТВЕРЖДАЮ»
Врио директора НИИ Онкологии ТНИМЦ
профессор, д.м.н. Чернов В.И.
«31» 05 2025 г.

АКТ
о внедрении в практику НИИ Онкологии ТНИМЦ
результатов диссертационной работы Варвашеня Руслана Николаевича

«Разработка таргетного радиофармацевтического лекарственного препарата для диагностики HER2-позитивного рака молочной железы»

1. Наименование учреждения, где внедряется работа: НИИ онкологии ТНИМЦ
2. Наименование и сущность внедряемой работы: Методика получения меченных технецием-99м рекомбинантных таргетных молекул белковой природы с анкириновыми повторам (DARPin), специфичных к рецептору HER2. Методика оценки радиохимической чистоты методом тонкослойной радиохроматографии радиофармацевтических лекарственных препаратов на основе белков и технеция-99м. Методика определения стабильности в растворе технеций-99м-содержащих препаратов.
3. Наименование учреждения, где произведена работа: НИИ онкологии ТНИМЦ.
4. Форма внедрения: *методика получения меченных технецием-99м рекомбинантных таргетных молекул белковой природы с анкириновыми повторам (DARPin), специфичных к рецептору HER2. Методика оценки радиохимической чистоты методом тонкослойной радиохроматографии радиофармацевтических лекарственных препаратов на основе белков и технеция-99м. Методика определения стабильности в растворе технеций-99м-содержащих препаратов.*
5. Внедрение проводилось с 2025 г.
6. Ответственный за внедрение и исполнитель Варвашеня Р.Н.
7. Эффективность внедрения: выход при получении меченных технецием-99м DARPin составляет свыше 95 %. Методика для оценки РЧХ методом тонкослойной радиохроматографии экспрессная, специфичная и характеризуется низкой вариабельностью рядов. Методика определения стабильности позволяет информативно и достоверно характеризовать стабильность препаратов в течение одного периода полураспада радионуклида.
8. Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрения: с применением данных методик увеличится эффективность получения и контроля качества технеций-99м-содрежащий препаратов.

Подписи ответственного за внедрение: Варвашеня Р.Н.

Председатель комиссии: д.м.н. Медведева А.А.

Члены комиссии:

к.м.н. Рыбина А.Н.

д.м.н. Зельчан Р.В.