

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РАДИОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



БОРОДИНА МАРИЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**ТАРГЕТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА HER2/NEU У
БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕЧЕННОГО ТЕХНЕЦИЕМ-99М КАРКАСНОГО ПРОТЕИНА DARPIN-
(HE)3-G3**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

3.1.25. Лучевая диагностика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук
Феденко Александр Александрович
доктор медицинских наук
Брагина Ольга Дмитриевна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
1.1 Рак молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu.....	21
1.2 Радионуклидная молекулярная диагностика злокачественных образований	27
1.2.1 Развитие молекулярной детекции рецептора HER2/neu у больных раком молочной железы	30
1.2.2 Дарпины для детекции рецептора HER2/neu у больных раком молочной железы.....	36
1.2.3 Оценка эффективности неоадьювантной терапии HER2-позитивного рака молочной железы с использованием методов молекулярной визуализации.....	41
1.3 Заключение по литературному обзору.....	43
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	46
2.1 Дизайн исследования.....	47
2.2 Характеристика клинического материала.....	48
2.3 Методы исследования.....	54
2.3.1 Приготовление радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m} Tc]Tc-(HE) ₃ -G3.....	54
2.3.2 Догоспитальное клинико-инструментальное обследование больных раком молочной железы.....	56
2.3.3 Морфологические методы исследования.....	58
2.3.4 Радионуклидные методы исследования.....	59
2.4 Статистическая обработка материала.....	63
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	64
3.1 Анализ накопления препарата [^{99m} Tc]Tc-(HE) ₃ -G3 в первичной опухоли и печени у больных раком молочной железы в различные временные интервалы	64

3.2 Определение оптимального диагностического критерия для дифференцировки статуса HER2/неу в первичной опухоли молочной железы с использованием препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$	68
3.2.1 Модель логистической регрессии для прогнозирования экспрессии HER2/неу в первичной опухоли молочной железы при применении $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$	71
3.3 Корреляция накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с основными клинико-морфологическими параметрами у больных раком молочной железы.....	73
3.4 Сопоставление накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с эффективностью предоперационного лечения у больных раком молочной железы.....	85
3.5 Соотношение накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с выживаемостью у больных раком молочной железы	87
3.5.1 Модель логистической регрессии для прогнозирования развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы при использовании радиофармацевтического препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	94
ВЫВОДЫ.....	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В настоящее время в онкологической практике широко применяется концепция персонифицированной медицины, к одному из наиболее стремительно развивающихся направлений которой относится *тераностика* (Чернов В.М. и соавт., 2018; Tolmachev V. et al., 2020). Термин «тераностика» объединяет в себе понятия «*терапия*» и «*диагностика*» и подразумевает использование агентов или методов, включающих диагностическую визуализацию и таргетную терапию (Брагина О.Д. и соавт., 2022; Turner N.H. et al., 2013). При этом, «визуализирующий» этап тераностического подхода состоит из обработки изображений, визуализации биологической мишени и идентификации подгруппы пациентов, у которых ожидается наибольшая эффективность планируемого лечения; последующий же «терапевтический» этап представляет собой введение лекарственного агента, воздействующего на выявленные ранее мишени (Брагина О.Д. и соавт., 2019; Bragina O. et al., 2022). Основными целями данной стратегии являются повышение эффективности проводимой терапии, улучшение показателей выживаемости онкологических больных, снижение побочных реакций и вытекающее из этого уменьшение общих затрат. Стремительный прогресс в развитии тераностического подхода во многом обусловлен получением новых данных о молекулярных основах канцерогенеза, созданием технологий изготовления новых биологических агентов, а также улучшением качества и точности диагностических приборов (Krasniqi A. et al., 2018; Eissler N. et al., 2024).

Рецептор эпидермального фактора роста HER2/neu. Одной из наиболее изученных молекулярных мишеней, встречающихся на поверхности опухолевых клеток, является рецептор эпидермального фактора роста 2 типа (HER2/neu), относящийся к семейству

трансмембранных рецепторов тирозинкиназ EGF (рецептор эпидермального фактора роста: ErbB1/HER1; ErbB2/HER2; ErbB3/HER3; ErbB4/HER4) и регулирующий процессы клеточного деления, роста, дифференцировки, пролиферации, миграции и апоптоза (Gutierrez C. et al., 2011; Nagini S. et al., 2017; Grassini D. et al., 2022).

Наиболее часто гиперэкспрессия HER2/neu и/или амплификация гена ERBB2 отмечается при инвазивном раке молочной железы (РМЖ) (Broughton M.N. et al., 2017; Ahn S. et al., 2020) (частота 15 – 20 % случаев) и является неблагоприятным прогностическим фактором у данной категории пациентов, что проявляется агрессивным течением заболевания, а также низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости (Cronin K.A. et al., 2010). Помимо этого, положительная экспрессия данного рецептора, согласно российским и международным клиническим рекомендациям, требует назначения направленного (таргетного) лечения с использованием таких таргетных препаратов, как трастузумаб (Герцептин), пертузумаб (Перьета), лапатиниб (Тайверб), трастузумаб эмтанзин (Т-DM1, Кадсила), а также трастузумаб дерукстекан (Энхерту) (Тюляндин С.А. и соавт., 2023; Slamon D.J. et al., 2011; Swain S.M. et al., 2015; Modi S. et al., 2020; Cortes J. et al., 2022), что увеличивает частоту ответа, показателей общей, безрецидивной выживаемости, а также выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости (Тюляндин С.А. и соавт., 2022; Schneeweiss A. et al., 2014).

Избирательность таргетной терапии диктует необходимость тщательного отбора кандидатов (Liu M.A. et al., 2019; Tsai T.F. et al., 2019). В настоящее время для определения статуса HER2/neu используются методики, оценивающие экспрессию маркера на уровне белка, ДНК и РНК. Наибольшее распространение получили одобренные FDA иммуногистохимическое исследование (ИГХ) и флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) (Wesola M.A. et al., 2015; Wollf A.C. et al., 2023). С клинической точки зрения их существенным недостатком на

диагностическом этапе является невозможность одномоментной оценки распространенности опухолевого процесса *in vivo* с анализом молекулярных характеристик выявленных опухолевых очагов до назначения специального лечения (Griguolo G. et al., 2019; Osana A. et al., 2020). Данный факт имеет особое значение в аспекте все чаще обсуждаемой межопухолевой гетерогенности экспрессии HER2/neu в первичной опухоли, регионарных и отдаленных метастатических очагах, что может встречаться по данным различных анализов до 6 – 48 % случаев (Lower E.E. et al., 2017; Schrijver W.M. et al., 2018). Наиболее существенное значение данный факт имеет при метастатическом и местно-распространенном раках молочной железы, характеризующихся длительным и «волнообразным» течением и требующих комплексного и продолжительного лечения. Выполнение же биопсии из существующих и/или вновь выявленных метастатических очагов для оптимизации тактики лечения у каждого пациента порой технически невозможно, либо может повлечь за собой серьезные осложнения (Turner N.H. et al., 2013).

Радионуклидные методы диагностики HER2-позитивного рака молочной железы. В последние годы для выявления злокачественных новообразований изучаются таргетные радионуклидные методы исследования (Брагина О.Д., 2021; Jadvar G. et al., 2018). По сравнению с «инвазивными» методами диагностики, молекулярная радионуклидная визуализация онкологических заболеваний позволяет не только одномоментно определить анатомическое расположение опухолевых очагов (одномоментная визуализация первичной опухоли, регионарных лимфатических узлов и отдаленных органов и тканей) (Bodei L. et al., 2022), но и оценить их молекулярные характеристики, например экспрессию HER2/neu. К дополнительным преимуществам данной методики относятся неинвазивный характер исследования с возможностью проведения повторных визуализаций и оценка экспрессии таргетного маркера в динамике проводимого лечения (Gallivanone F et al., 2017).

Структура радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) как правило одинакова и состоит из «нацеливающего» модуля (или лиганд-мишень), соединенного с помощью линкера/хелатора с «визуализирующим» компонентом (диагностическим радиоизотопом). Введенный в организм пациента РФЛП взаимодействует с искомой мишенью (рецептором), а излучение изотопа при этом регистрируется внешними детекторами (Jadvar G et al., 2018; Bragina O. et al., 2022).

В настоящее время в качестве неинвазивных диагностических методик в ядерной медицине используются однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ). В зависимости от излучения (гамма-кванты или β -положительные излучатели), которое исходит от радионуклида основным принципом разделения РФЛП является метод получения изображения (Li L. et al., 2017; Ljungberg M. et al., 2018). ОФЭКТ получила широкое распространение во многом благодаря своей низкой себестоимости, в то время как ПЭТ-диагностика, имеющая более высокую стоимость, обеспечивает значительно лучшую чувствительность, пространственное разрешение и точность количественного определения. В тоже время, недавнее внедрение сканеров для ОФЭКТ-диагностики на основе теллурида кадмия и цинка позволяет значительно увеличить чувствительность и разрешение камеры (Massicano A.V. et al., 2018).

Альтернативные каркасные белки. В настоящее время большую популярность в качестве «нацеливающих» модулей приобретает новый класс таргетных молекул, получивших название «альтернативные каркасные белки» (АКБ) или «скаффолды» (scaffolds) и отвечающих всем требованиям для оптимальной доставки радионуклида к опухолевым клеткам. К несомненным преимуществам таких конструкций относятся значительно меньшие размеры по сравнению со стандартным антителом, что увеличивает проникновение вещества в опухоль; стабильная структура; дополнительная функционализация и экспрессия в бактериальной системе,

обеспечивающие низкие затраты на производство; высокая термостабильность, способствующая длительному хранению препарата при комнатной температуре, возможность прямого химического синтеза, а также быстрое выведение из организма пациента, что существенно сокращает время от момента введения РФП до начала исследования (Bragina O. et al., 2022; Larkina M. et al., 2022).

Одними из представителей АКБ являются *Дарпины* (DARPin – Designed Ankyrin Repeat Proteins), которые были сконструированы на основе белков анкиринов, участвующих в прикреплении мембранных белков к цитоскелету (Брагина О.Д. и соавт., 2021; Ко F.P. et al., 2016). Каркас Дарпинов может включать 4-6 анкириновых доменов, каждый из которых содержит 33 аминокислоты; домены организованы как две антипараллельные альфа-спирали с бета-поворотом между ними. Поскольку молекулярная масса одного модуля чуть больше 3,5 кДа, а дарпины состоят из 4–6 модулей, их молекулярный вес колеблется от 14 до 21 кДа и составляет примерно одну десятую размера обычного антитела (IgG) или одну треть размера Fab. Доклинические исследования различных вариаций дарпинов показали их высокую тропность и специфичность к рецептору HER2/neu (Gabriele F. et al., 2023; Deyev S.M. et al., 2024).

Результаты доклинических *in vitro* и *in vivo* исследований меченой технецием-99m молекулы DARPin(HE)₃-G3 продемонстрировали ее высокую специфичность и пикомолярную аффинность к рецептору HER2/neu и перспективность ее дальнейшего клинического изучения (Vorobyeva A. et al., 2018; Vorobyeva A. et al., 2019). Результаты I фазы клинических испытаний продемонстрировали у больных раком молочной железы с использованием препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 показали его безопасность, удовлетворительные фармакокинетические свойства, а также более высокое накопление в опухолях молочной железы с высокой экспрессией рецептора HER2/neu ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test). Вопросы, касающиеся выбора дозировки протеина для дальнейшего клинического

исследования, были затронуты в ходе выполненного анализа лишь частично (Bragina O., 2022).

Изменение парадигм в отношении эффективности таргетных препаратов (в частности, трастузумаба дерукстекана) в опухолях молочной железы с низкими значениями рецептора HER2/neu (Cortes J. et al., 2021), а также в отношении бинарного подхода оценки его экспрессии, способствовало увеличению интереса к возможной эффективности таргетной радионуклидной терапии, проводимой в аспекте тераностического подхода (Denkert C. et al., 2021; Barolia A. et al., 2023). В этом случае, при смене диагностического этапа на терапевтический важным будет выбор категорий пациентов с различной экспрессией HER2/neu, у которых можно ожидать наибольший эффект от проводимого лечения. В связи с этим, актуальным также является изучение корреляции накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с основными клинико-морфологическими параметрами, эффективностью предоперационного лечения и показателями выживаемости, что будет способствовать усилению понимания биологических процессов, а также выделению групп пациентов с потенциальной выгодой от таргетной радионуклидной терапии.

Учитывая мировые тенденции и перспективность данного научного направления в детекции статуса HER2/neu, в коллаборации в НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томского политехнического университета (ТПУ), Института биоорганической химии (ИБХ) имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, а также Уппсальского университета (Швеция) было запланировано продолжение клинических испытаний препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с определением оптимальной дозировки протеина и времени исследования после его введения, выделения диагностических критериев для дифференцировки первичной опухоли в зависимости от статуса HER2/neu, а также корреляция накопления с

клинико-морфологическими характеристиками, эффективностью предоперационного системного лечения и выживаемостью у больных раком молочной железы.

Степень разработанности темы

Стремительное развитие молекулярных технологий и необходимость совершенствования существующих диагностических методик у больных злокачественными образованиями в течение последних тридцати лет, способствовало синтезу и изучению различных неиммуноглобулиновых каркасных протеинов, тропных к рецептору HER2/neu. Основными преимуществами данных молекул являются отсутствие иммуногенности, высокая термостабильность, возможность быстрой химической модификации при проведении процессов мечения, быстрая элиминация из организма пациента, что существенно сокращает временной интервал между введением препарата и началом исследования (Tolmachev V. et al., 2020).

К настоящему времени отделением радионуклидной терапии и диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ совместно с Томским политехническим университетом (ТПУ), Институтом биоорганической химии (ИБХ) имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, а также Уппсальским университетом (Швеция) накоплен большой опыт по таргетной радионуклидной диагностике рецептора HER2/neu у больных раком молочной железы. Так первым препаратом, прошедшим клиническую апробацию, является [^{99m}Tc]Tc-DARPin9_29, который продемонстрировал свою безопасность, а также высокую специфичность в типировании опухолей молочной железы с положительной и отрицательной экспрессией HER2/neu ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test) (Брагина О.Д. и соавт., 2021). Несмотря на это, в ходе исследования была определена неэффективность использования данного соединения для оценки состояния печени и,

соответственно, нецелесообразность его дальнейшего использования в диагностическом алгоритме обследования больных РМЖ (Брагина О.Д. и соавт., 2021; Vorobyeva A. et al., 2018).

Выполненная I фаза клинических исследований препарата [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 на базе отделения радионуклидной терапии и диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ продемонстрировала хорошую переносимость соединения, отсутствие изменений функционирования жизненно важных органов и возможность его использования для дифференцировки статуса HER2/neu в первичных опухолях молочной железы ($p < 0,05$, Mann-Whitney test) (Bragina O. et al., 2021). Еще одно клиническое исследование с препаратом [^{99m}Tc]Tc-ZHER2:41071 показало его безопасность, хорошую фармакокинетику и возможность дифференцировки статуса HER2/neu в первичной опухоли молочной железы при использовании дозировки 1000 мкг через 2 часа после введения ($p < 0,05$, Mann-Whitney test) (Bragina O. et al., 2023).

Принципиальное значение имеет выполненная I фаза клинических испытаний препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с использованием в качестве «таргетного» модуля протеина DARPinG3, синтез которого осуществляется на территории Российской Федерации. Результатами выполненного анализа была показана безопасность, удовлетворительные фармакокинетические свойства, а также более высокое накопление в опухолях молочной железы с высокой экспрессией рецептора HER2/neu ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test) (Bragina O. et al., 2022). Полученные положительные данные обусловили необходимость продолжения исследований и расширения их объема с определением оптимальной дозировки протеина и времени исследования после его введения, выделения диагностических критериев для дифференцировки первичной опухоли в зависимости от статуса HER2/neu, а также корреляция накопления с клинко-морфологическими характеристиками, эффективностью предоперационного системного лечения и выживаемостью у больных раком молочной железы.

Цель исследования

Оценить возможности таргетной детекции рецептора HER2/neu в первичной опухоли больных раком молочной железы с использованием радиофармацевтического лекарственного препарата на основе меченного технецием-99m каркасного протеина DARPIn(HE)₃-G3 и сопоставить его накопление с основными клинико-морфологическими параметрами, эффективностью предоперационной терапии и выживаемостью.

Задачи исследования

1) Определить оптимальную дозировку протеина для приготовления радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 и время исследования для определения статуса HER2/neu в первичной опухоли больных раком молочной железы.

2) Выявить наиболее информативный диагностический критерий для дифференцировки статуса HER2/neu в первичной опухоли больных раком молочной железы при использовании препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3.

3) Соотнести аккумуляцию радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с основными клинико-морфологическими параметрами у больных раком молочной железы.

4) Определить связь накопления радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с эффективностью предоперационного лечения у больных раком молочной железы.

5) Провести корреляционный анализ накопления радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с выживаемостью у больных раком молочной железы.

Научная новизна

Впервые продемонстрирована возможность определения статуса HER2/neu в первичных опухолях с использованием радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в дозировке протеина 3000 мкг через 4 часа после введения у больных раком молочной железы.

Впервые выявлено, что наиболее информативным диагностическим критерием для дифференцировки статуса HER2/neu в первичной опухоли у больных раком молочной железы при использовании радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 является параметр накопления в опухоли с пороговым значением ≥ 1975 импульсов с показателями чувствительности и специфичности 85,71 % и 81,25 %.

Впервые определена связь уровня накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с возрастом пациента, размером первичной опухоли, стадией заболевания и молекулярно-биологическим подтипом больных раком молочной железы.

Впервые определено отсутствие корреляции накопления радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с ответом опухоли на предоперационное лечение у больных раком молочной железы.

Впервые показано, что использование порогового значения соотношения опухоль/ШМС равного 2,12 отн. ед. с чувствительностью и специфичностью 70 % и 90 % позволяет прогнозировать развитие гематогенных метастазов у больных раком молочной железы при использовании радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3.

Теоретическая и практическая значимость

Выполненный объем работ и полученные в ходе исследования результаты позволяют судить о возможностях таргетной радионуклидной детекции рецептора HER2/neu в первичной опухоли у больных раком молочной железы с использованием синтетических каркасных протеинов в клинической практике.

Практическую значимость работы составляют результаты, ассоциированные с возможностью применения радиоармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 для дифференцировки статуса рецептора HER2/neu в первичной опухоли больных раком молочной железы. При этом, оптимальным диагностическим критериями для достижения этой цели является параметр накопления в опухоли с пороговым значением ≥ 1975 импульсов с показателями чувствительности и специфичности 85,71 % и 81,25 %.

Дополнительное значение для практической медицины приобретает возможность использования порогового значения соотношения опухоль/ШМС препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3, который при показателе $\geq 2,12$ отн. ед. прогнозирует высокий риск развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы с чувствительностью и специфичностью 70 % и 90 %.

Методология и методы исследования

Основой методологии данной диссертации являются современные теоретические и практические знания отечественной и зарубежной онкологии и радионуклидной диагностики.

Представленная работа была выполнена на проспективном клиническом материале, включающем 50 больных раком молочной железы до начала системного лечения. Выполненные исследования проведены с

использованием современных диагностических, морфологических, молекулярных, радиоизотопных, клинических и статистических методов.

На первом этапе исследования были определены оптимальные дозировка протеина, а также время исследования после введения для дальнейшего клинического использования.

Второй этап включал определение наиболее информативного диагностического критерия для оценки статуса HER2/neu в первичной опухоли больных раком молочной железы при использовании препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 путем анализа таких показателей, как накопление в опухоли, контрлатеральном участке противоположной молочной железы (фон), печени и широчайшей мышце спины, а также соотношений опухоль/фон, опухоль/печень и опухоль/широчайшая мышца спины. Помимо этого, проводилось соотношение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с основными клинико-морфологическими параметрами (возраст, состояние менструальной функции, размер опухоли, состояние регионарных лимфатических узлов, экспрессия рецептора эстрогена и маркера клеточной пролиферации Ki67, молекулярно-биологический подтип), а также эффективностью предоперационного лечения и выживаемостью.

Результаты выполненного исследования позволяют расширить представления о возможностях клинического применения радиофармацевтического препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных раком молочной железы и его использовании в качестве дополнительного диагностического метода для оценки распространенности опухолевого процесса и статуса HER2/neu в первичной опухоли, а также определить связь накопления препарата с эффективностью предоперационного лечения и выживаемостью.

Положения, выносимые на защиту

1. Оптимальным для клинического использования у больных раком молочной железы является применение радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в дозировке протеина 3000 мкг с выполнением исследования через 4 часа после введения.

2. Наиболее информативным диагностическим критерием для дифференцировки статуса HER2/neu в первичной опухоли молочной железы при использовании радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 является параметр накопления в опухоли с пороговым значением ≥ 1975 импульсов с показателями чувствительности и специфичности 85,71 % и 81,25 %.

3. Пороговое значение соотношения опухоль/ШМС $\geq 2,12$ отн. ед. с чувствительностью и специфичностью 70 % и 90 % прогнозирует высокий риск развития гематогенных метастазов при использовании радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных раком молочной железы.

Степень достоверности результатов

Высокая достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинического материала, а также использованием адекватных поставленным задачам методологий и современных методов статистического анализа.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на следующих научно-практических конференциях: III международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции

и перспективы» (19 сентября 2024 г., Россия, Томск); IV международном форуме онкологии и радиотерапии «Ради жизни – FOR LIFE» (16-20 сентября 2024 г., Москва); V Юбилейном национальном международном конгрессе с международным участием «Времена года. Женское здоровье от юного до серебряного и золотого возраста» (17-18 октября 2024 г., Москва).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и цитируемых в базах Scopus и Web of Science, зарегистрирована 1 база данных.

Внедрение результатов исследования в клиническую практику

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, в настоящее время используются в процессе обучения студентов и аспирантов лаборатории иммунологии, генетики и патологии, лаборатории медицинской химии Уппсальского университета (Швеция), а также в научно-исследовательском центре «Онкотераностика» Томского политехнического института. Результаты исследования внедрены в клиническую работу отделений радионуклидной терапии и диагностики, общей онкологии и химиотерапии НИИ онкологии Томского НИМЦ, а также отделения дневного стационара лекарственного лечения опухолей Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в поиске и изучении имеющейся по теме диссертационного исследования литературы, разработке дизайна исследований, анализе фактического материала, статистической обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке научных публикаций по результатам исследования, а также оформлении базы данных, отражающей сведения по клиническим, иммуногистохимическим и радиоизотопным исследованиям.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, 1 главы собственных исследований с обсуждением полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, включает список сокращений и список литературы. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 26 таблицами. Список литературы содержит 169 источников, из которых 13 отечественных и 156 зарубежных.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Рак молочной железы (РМЖ) остается наиболее распространенной онкологической патологией уже на протяжении многих десятилетий, от которой страдает приблизительно одна из семи женщин в индустриальных странах [22, 64, 139]. Данное злокачественное заболевание встречается у представительниц женского населения детородного возраста во всех странах мира независимо от возраста и национальности [126]. Так в 2022 году РМЖ был выявлен более чем у 2 миллионов женщин, а показатели смертности во всем мире составили 670 000 случаев смерти. Показатели заболеваемости в Российской Федерации в 2022 году составили 670 000 новых случаев, смертности – 76 591 (12,2 % в структуре онкологических заболеваний) [1]. Начиная с 2012 года, стремительный прогресс в диагностике и усовершенствовании методов локального и системного лечения рака молочной железы привел к увеличению продолжительности жизни данной категории пациентов [18, 144]. Во многом это стало возможно благодаря широкому внедрению персонифицированного подхода, основанного на индивидуальной чувствительности опухоли к тому или иному виду лечения [13, 69, 141].

РМЖ представляет собой гетерогенное заболевание, на течение и выбор лечения которого существенное влияние оказывают ряд морфологических, молекулярных и биологических характеристик [103]. В связи с этим, в клинической практике активно применяется классификация, за основу которой используется распределение злокачественных опухолей молочной железы согласно их молекулярному фенотипу [43, 116, 152, 157]. Для разделения больных на молекулярные подтипы традиционно анализируются суррогатные маркеры, к которым относятся рецепторы стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона) (РЭ и РП), маркер

клеточной пролиферации Ki67 и рецептор эпидермального фактора роста HER2/neu [117]. Подобное типирование опухолей играет значение не только для выбора объема системного лечения, но и для определения прогноза заболевания и риска локального и отдаленного метастазирования (таблица 1) [10].

Таблица 1 – Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы (RUSSCO, 2024)

Молекулярно-биологический подтип рака молочной железы	Клинико-патологическое (суррогатное) определение подтипа
Люминальный А подтип	Наличие всех факторов: - Рецепторы эстрогенов (РЭ) положительные; - HER2-отрицательный; - Ki67 низкий ($\leq 20\%$); - рецепторы прогестерона (РП) высокие ($\geq 20\%$)
Люминальный В (HER2- отрицательный)	- РЭ положительные; - HER2-отрицательный и наличие одного из следующих факторов: - Ki67 высокий ($\geq 30\%$); - РП низкие ($< 20\%$)
Люминальный В (HER2- положительный)	- РЭ положительные; - HER2-положительный; - Ki67 любой; - РП любые
HER2-положительный (не люминальный)	HER2-положительный; -РЭ и РП отрицательные; -Ki67 любой
Базальноподобный подтип	- отрицательные РЭ, РП, HER2 (тройной негативный протоковый)

1.1 Рак молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu

Рецептор эпидермального фактора роста 2 типа (HER2/neu). Относится к маркерам, определение которых является обязательным для понимания молекулярного портрета опухоли молочной железы и дальнейшего планирования индивидуального плана ведения пациентов (рисунок 1) [50, 55, 57, 123]. Наиболее часто высокая экспрессия HER2/neu встречается у больных РМЖ (15-20 %) и обуславливает быстрый клеточный рост, а также дифференцировку и пролиферацию опухолевых клеток [15, 31, 39, 56, 105]. В большем количестве случаев гиперэкспрессия HER2/neu ассоциирована с наличием генетических изменений (амплификацией) областей 17q12 – q21 [35, 164, 168].

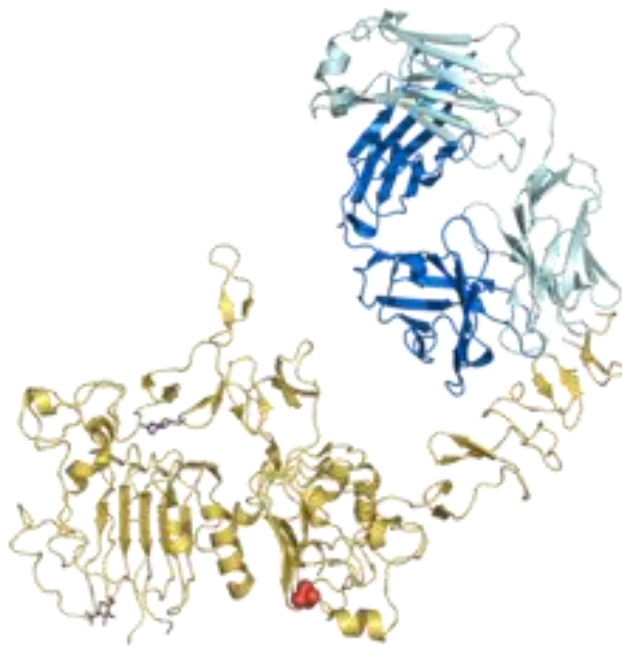


Рисунок 1 – Структура рецептора эпидермального фактора роста 2 типа (HER2/neu)

Все вышеперечисленное обуславливает неблагоприятный прогноз у больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu, который проявляется низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости [109, 112], а также высоким риском метастазирования в легкие и головной

мозг, что было продемонстрировано данными Slamon et al с выявлением корреляции высоких значений экспрессии HER2/neu и низких показателей общей ($p < 0,001$) и безрецидивной ($p < 0,0001$) выживаемости [129, 130].

Таргетная терапия HER2-позитивного РМЖ. Самой главной особенностью ведения пациентов с высокой экспрессией HER2/neu является необходимость добавления в объем системного лечения таргетной терапии, что является обязательным компонентом согласно российским и международным рекомендациям (таблица 2) [11, 12, 78, 90, 166]. В подавляющем большинстве случаев гиперэкспрессии HER2/neu требует неoadъювантного химио-таргетного лечения, назначение которого на предоперационном этапе при достижении полной морфологической регрессии является маркером благоприятного исхода заболевания, сопоставимого с Люминальными подтипами рака молочной железы [90, 100].

Таблица 2 – Рекомендуемый алгоритм назначения адъювантной системной терапии HER2-позитивного рака молочной железы в зависимости от стадии заболевания (RUSSCO, 2024)

Молекулярно-биологический подтип	Рекомендуемая адъювантная системная терапия	Примечания
Люм. В (HER2-пол.)	Химиотерапия + анти-HER2-терапия + гормональная терапия	При T1a (≤ 5 мм) и N0: только адъювантная ГТ; ХТ и анти-HER2-терапия не показаны; При T1b, c (>5 мм, но ≤ 20 мм) и N0 — трастузумаб в течение 12 мес. в сочетании с ХТ без антрациклинов: паклитаксел 12 еженедельных введений или DC (доцетаксел + циклофосфамид) 4 цикла; При T2–T3 (> 20 мм) или N (+): трастузумаб ± пертузумаб в течение 12

Молекулярно-биологический подтип	Рекомендуемая адъювантная системная терапия	Примечания
		мес. в сочетании с ХТ: доцетаксел + карбоплатин (6 циклов) или АС/ЕС (4 цикла), далее — доцетаксел 4 цикла/ 12 еженедельных введений паклитаксела) После завершения ХТ назначается адъювантная ГТ (одновременно с анти-HER2-терапией)
HER2- пол. (не люм.)	Химиотерапия + анти-HER2-терапия	<i>При T1a (≤ 5 мм) и N0:</i> системная терапия не показана; <i>При T1b, c (>5 мм, но ≤ 20 мм) и N0</i> — трастузумаб в течение 12 мес. в сочетании с одним из следующих режимов ХТ без антрациклинов: паклитаксел 12 еженедельных введений или DC (доцетаксел + циклофосфамид) 4 цикла; <i>При T2–T3 (> 20 мм) или N (+):</i> трастузумаб ± пер- тузумаб в течение 12 мес. в сочетании с одним из следующих режимов ХТ: доцетаксел + карбоплатин (6 циклов) или АС/ЕС (4 цикла), далее — доцетаксел 4 цикла/12 еженедельных введений паклитаксела); • после завершения ХТ продолжается анти-HER2-терапия

Первая доказанная эффективность использования таргетной терапии у больных метастатическим РМЖ была продемонстрирована препаратом Герцептин (трастузумаб) [91, 118], применение которого в сочетании с таксанами позволило увеличить частоту объективного ответа ($p < 0,001$), общую выживаемость (25,1 месяцев против 20,3 месяцев, $p = 0,46$) и

выживаемость без прогрессирования (7,4 месяцев против 4,6 месяцев, $p < 0,001$) [21, 54, 68].

Усовершенствование анти-HER2 терапии способствовало разработке двойной лекарственной экстрацеллюлярной блокады II и IV доменов рецептора HER2, что приводит к невозможности образования димеров и блокаде HER-опосредованных сигнальных путей [32, 61, 94]. Впервые эффективность сочетания Пертузумаба (Перьета) и Герцептина была показана у больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu с отдаленными метастазами, у которых отмечалось прогрессирование на фоне проводимого ранее лечения трастузумабом [19, 77].

Полученные результаты легли в основу изучения HER2-позитивного рака молочной железы в неоадьювантном режиме у больных операбельным и местно-распространенным раком молочной железы в рамках исследований NeoSphere2 и TRYPHAENA3 (2 фазы), а также CLEOPATRA (3 фаза) у больных метастатическим РМЖ [52, 65]. Так по данным исследований NeoSphere и TRYPHAENA отмечалось увеличение частоты полных морфологических регрессий до 49 % ($p = 0,0141$) и более 60 % ($p < 0,05$) соответственно. По результатам анализа CLEOPATRA сочетание трастузумаба + пертузумаба + доцетаксела увеличивало медианы общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования до 56,5 и 6,3 ($p < 0,001$) месяцев соответственно [88, 124, 140].

Относительно новым препаратом для лечения HER2-позитивного неоперабельного или метастатического рака молочной железы является *трастузумаб дерукстекан (Энхерту)*, одобренный Министерством Здравоохранения Российской Федерации для клинического использования [33, 36, 58]. Данный препарат представляет собой конъюгат антитела и цитостатика дерукстекана (ингибитор топоизомеразы I типа), прицельно взаимодействующий с рецептором HER2/neu [41, 65, 89].

Так, по результатам II фазы открытого многоцентрового клинического исследования DESTINY-Breast01 монотерапия трастузумабом

дерукстеканом у больных HER2-позитивным раком молочной железы с предшествующим лекарственным лечением (два и более курса анти-HER2-терапии) позволяет добиться контроля заболевания у 97,3 % пациентов и объективного ответа у 62 % [95, 121].

Сравнение эффективности терапии препаратов трастузумаба дерукстекана и трастузумаба эмтанзина у больных HER2-позитивным метастатическим раком молочной железы с предыдущей терапией трастузумабом и таксанами, проведенное в рамках III фазы открытого, многоцентрового, рандомизированного исследования DESTINY-Breast03, продемонстрировало выживаемость без прогрессирования в течение 12 месяцев в первом случае в 75,8 %, во втором – 34,1 %. Полный или частичный ответы наблюдались в группе пациентов, получавших трастузумаб дерукстекан в 79,7 % случаев, трастузумаб эмтанзин – в 34,2 % [96].

Диагностика экспрессии HER2/neu. Несомненно, высокая специфичность таргетной терапии, а также ее стоимость и количество нежелательных побочных реакций обуславливает необходимость точной диагностики и строго отбора пациентов [42, 59]. По современным клиническим рекомендациям стандартами определения экспрессии HER2/neu в опухолевой ткани является иммуногистохимическое исследование [61, 82, 105, 138].

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) [97, 99, 142] является наиболее часто используемой в клинической практике методикой детекции HER2/neu с оценкой экспрессии на поверхности опухолевых клеток в фиксированной формалином ткани [66, 137, 145, 151]. Стандартами оценки экспрессии рецептора эпидермального фактора роста 2 типа являются критерии, определенные Американским обществом клинической онкологии (ASCO/CAP, 2023) [160, 161, 162, 163], при этом, *негативными* считаются случаи с экспрессией «0» и «1+», к *положительными* – «3+». Случаи, оцененные как 2+ являются неопределенными и требуют

дополнительного исследования в объеме *флуоресцентной гибридизации in situ* (FISH) [109, 151, 155] или *хромогенной гибридизации in situ* (CISH) для определения амплификации гена ERBB2 [145]. При этом, выполнение FISH и CISH анализов характеризуется более объективными количественными результатами, что несомненно связано с большей стабильностью ДНК и наличием внутренних контролей, состоящих из неамплифицированных сигналов в прилежащих к опухоли структурах [14, 24, 44, 158].

Существенными недостатками вышеописанных методик тем не менее являются необходимость забора материала (биопсия/core-биопсия) [84], что, несомненно, может нести за собой технические трудности и развитие нежелательных явлений в виде кровотечений и излишней травматизации окружающих тканей (например, сложности при выполнении биопсии печени) [53, 76]. С морфологической точки зрения исследование исключительно биопсийного материала может не учитывать такое явление как внутриопухолевая гетерогенность [102, 115], с клинической – затруднительной является оценка экспрессии молекулярных маркеров в регионарных и отдаленных метастатических очагах, а также изменение их экспрессии на фоне проводимого системного лечения или при прогрессировании заболевания [3].

Неоднозначным является и отношение к такому явлению, как межопухолевая гетерогенность, которая наиболее часто встречается при местно-распространенном и метастатическом раке молочной железы и [17, 63, 86, 87] характеризуется возможным различием молекулярных характеристик в выявленных опухолевых очагах [122, 153]. По данным литературы различие в экспрессии HER2/neu между первичной опухолью и регионарными/отдаленными метастазами может составлять до 48 % случаев [169].

Явление рецепторной дискордантности первичной опухоли и метастатических узлов во многом может быть обусловлено генетическими изменениями, приводящим к асинхронному рецепторному распространению

метастазов первичной опухоли. В связи с этим, выполнение биопсии метастатического узла помимо первичной опухоли при первичной диагностике и при прогрессировании заболевания имеет принципиальное значение для адекватного планирования системной терапии в случаях местно-распространенного и метастатического рака молочной железы [122, 169].

1.2 Радионуклидная молекулярная диагностика злокачественных образований

Относительно новое и стремительно развивающееся направление *молекулярной визуализации* позволяет оценить клеточные и молекулярные изменения различных мишеней (или биомаркеров) и определить их характеристики уже на ранних стадиях заболевания. При этом, наибольшее предпочтение в данной зоне научно-практического интереса отдается *радионуклидной детекции* маркеров рака молочной железы [29, 46].

Молекулярная радионуклидная визуализация определяется как метод исследования в ядерной медицине, позволяющий детектировать, характеризовать и оценивать биологическую активность опухоли человека и других живых систем на молекулярном и клеточном уровнях [136]. В частности, данный метод оценивает патофизиологические процессы *in vivo*, визуализируя специфические биомаркеры, их экспрессию, а также динамику изменений на клеточном и молекулярном уровнях до непосредственной манифестации патологического процесса. Структура радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) как правило одинакова и состоит из «нацеливающего» модуля (или лиганд-мишень), соединенного с помощью линкера/хелатора с «визуализирующим» компонентом (диагностическим радиоизотопом). Введенный в организм пациента РФЛП взаимодействует с искомой мишенью (рецептором), а излучение изотопа при этом регистрируется внешними детекторами [25, 67].

Данный метод прицельной визуализации способствует решению не только проблемы *анатомической детекции* опухолевых очагов в организме больных РМЖ, оптимизируя количество выполняемых на доклиническом этапе диагностических процедур [93]. Но главным образом, позволяет оценивать молекулярные особенности регионарных и отдаленных метастатических узлов, минимизируя количество инвазивных процедур с перспективой их последующей оценки на этапах лечения [29, 149] (рисунок 2).

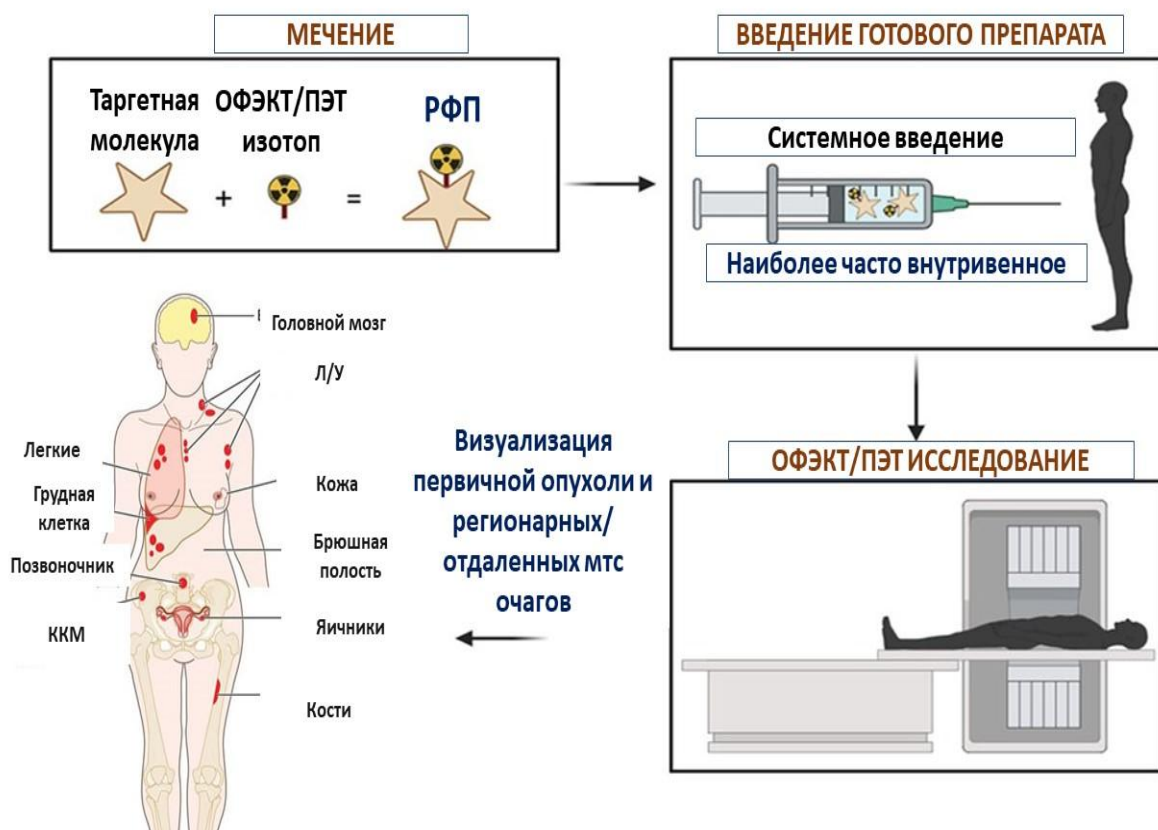


Рисунок 2 – Основные принципы таргетной радионуклиной визуализации у больных раком молочной железы

В настоящее время в качестве неинвазивных диагностических методик в ядерной медицине используются однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ). В зависимости от излучения (гамма-кванты или β -

положительные излучатели), которое исходит от радионуклида основным принципом разделения РФЛП является метод получения изображения [108]. Так в настоящее время выделяют препараты для ОФЭКТ с использованием изотопов технеция-99m (^{99m}Tc , период полураспада 6,01 часов), йода-123 (^{123}I , период полураспада 13,3 часов) и индия-111 (^{111}In , период полураспада 2,8 дней) и для ПЭТ с применением кислорода-15 (^{15}O , период полураспада 2,03 минуты), азота-13 (^{13}N , период полураспада 9,97 минуты), углерода-11 (^{11}C , период полураспада 20,4 минуты), галлия-68 (^{68}Ga , период полураспада 67,6 минут), фтора-18 (^{18}F , период полураспада 109,8 минут), меди-64 (^{64}Cu , период полураспада 12,7 часов), брома-76 (^{76}Br , период полураспада 16,2 часов), циркония-89 (^{89}Zr , период полураспада 78,4 часов), йода-124 (^{124}I , период полураспада 100 часов) [93].

Радиоактивно меченные модули при введении в организм пациента прицельно взаимодействуют с искомым рецептором и дают представление не только о статусе экспрессии маркера в конкретном органе, но и в принципе об их биологическом распределении. При этом, качественно выполненное исследование может оптимизировать стратификацию пациентов в зависимости от планируемого лечения, а также на ранних этапах прогнозировать эффективность лекарственной терапии.

На сегодняшний день для стадирования больных местнораспространенным и метастатическим раком молочной железы применяется ПЭТ с аналогом глюкозы – 2-фтор-2-дезоксид-глюкоза (ФДГ). Так ряд исследований продемонстрировали повышенную чувствительность ПЭТ/КТ с ФДГ по сравнению с такими методами визуализации как компьютерная томография с контрастированием и остеосцинтиграфия [83].

При этом, чувствительность методики составляет 95-100 %, в то время как для традиционных диагностических методик – 56-57 %. При сравнении эффективности ПЭТ и магнитно-резонансной томографии в диагностике костных метастазов – чувствительность в обоих случаях составила 90 %.

Несмотря на повсеместное распространение ПЭТ и его использования для визуализации химических и биологических процессов при злокачественных образованиях и других патологических состояниях с большей чувствительностью, преимуществами ОФЭКТ в данной ситуации являются экономичность и доступность проведения исследования. К наиболее оптимальному для данных целей радиоизотопу относят технеций- ^{99m}Tc , небольшой период полураспада которого позволяет выполнять радионуклидные исследования непосредственно в день инъекции РФЛП пациенту [85]. В настоящее время до 80 % диагностических исследования на ОФЭКТ проводятся с использованием ^{99m}Tc , а непрерывное усовершенствование технической базы способствует расширению объема и перспективности данной методики [81, 110].

1.2.1 Развитие молекулярной детекции рецептора HER2 у больных раком молочной железы

Полноразмерные антитела. На момент создания активно развивающегося направления таргетной молекулярной визуализации в качестве «нацеливающих» модулей использовались полноразмерные антитела, основной принцип прицельного взаимодействия которых стал использоваться для направленной доставки радиоизотопов к опухолевым клеткам и соответственно их визуализации [167]. Наиболее важными клиническим исследованием стало изучение меченных долгоживущими позитронными эмиттерами структур, таких как ^{89}Zr (циркониум-89), ^{64}Cu (медь-64), ^{124}I (йод-124) и ^{86}Y (иттрий-86) [107].

Первым радиохимическим соединением для оценки статуса HER2/neu стал препарат « ^{111}In -трастузумаб» (^{111}In , период полураспада 2,8 дней), который был апробирован у больных РМЖ [111]. Последующие исследования « ^{111}In -трастузумаб» продемонстрировали более интенсивное накопление соединения опухолевой тканью по сравнению с

контралатеральными участками противоположной молочной железы (таблица 3).

Таблица 3 – Визуализация HER2-позитивного рака молочной железы с использованием таргетной радионуклидной диагностики (клинические исследования)

Тип протеина	Название препарата	Способ визуализации	Категории пациентов	Исследование (автор)
мкАТ	⁸⁹ Zr-трастузумаб	ПЭТ/КТ	Мет-й РМЖ	Dijkers et al., 2010 [34]; Gebhart et al, 2016 [45]; Ulaner et al, 2017 [147]
	¹¹¹ In-трастузумаб	ОФЭКТ/КТ	Мет-й РМЖ	Behr et al, 2001 [18]; Perik et al, 2006 [104]; Sietske et al, 2014 [120]
	⁶⁴ Cu-трастузумаб	ПЭТ/КТ	Первичный и мет-й РМЖ	Tamura et al, 2013 [136]; Mortimer et al, 2014 [92]
Фрагменты антител	⁶⁸ Ga-DOTA-F(ab') ₂ -трастузумаб	ПЭТ/КТ	Мет-й РМЖ	Beylergil et al, 2013 [20]
	⁶⁸ Ga-HER2-Нанободи	ПЭТ/КТ	Мет-й РМЖ	Keyaerts et al, 2016 [65, 66]
АКБ	¹¹¹ In-ABY-002 ⁶⁸ Ga-ABY-002	ОФЭКТ/КТ ПЭТ/КТ	Мет-й РМЖ	Baum et al, 2010 [17]
	¹¹¹ In-ABY-025	ОФЭКТ/КТ	Местно-й и мет-й РМЖ	Sorensen et al, 2014 [126]; Sandberg et al, 2016 [112];
	⁶⁸ Ga-ABY-025	ПЭТ/КТ	Местно-й и мет-й РМЖ	Sandstrom et al, 2016 [113]; Sorensen et al, 2017 [127]
	^{99m} TcZHER2: 41071	ОФЭКТ	Операбельный, местно-й и мет-й РМЖ	Bragina et al, 2023 [23]
	^{99m} Tc-ADAPT6	ОФЭКТ	Оп-ный, местно-й и мет-й РМЖ	Bragina et al, 2021 [27]
Примечания: 1 *Мет-й – метастатический РМЖ; 2 местно-й – местно-распространенный РМЖ 3 Оп-ый – операбельный				

Еще одним препаратом для изучения стал « ^{89}Zr -трастузумаб» (^{89}Zr , период полураспада 78,4 часов), использование которого показало его высокую аккумуляцию в опухолевых очагах с гиперэкспрессией HER2/neu через 4-5 дней после введения, что было сопоставимо с данными компьютерной и магнитно-резонансной томографии [38]. Дополнительно проведенное исследование Ulaner et al в 4 случаях из 11 выявило метастатические узлы с высокой экспрессией HER2/neu при негативных первичных узлах [127, 154].

Изучение препарата « ^{64}Cu -трастузумаб» (^{64}Cu , период полураспада 12,7 часов) у больных с HER2-позитивным операбельным и метастатическим раком молочной железы продемонстрировало высокое накопление соединения в первичной опухоли и метастатических узлах различной локализации (кости, лимфатические узлы, печень, легкие и плевра) [98, 143].

Несмотря на удовлетворительные результаты, полученные в ходе клинических исследований, основными негативными моментами, ограничивающими использование полноразмерных антител, являлись медленная элиминация (снижение чувствительности визуализации и удлинение времени начала обследования до 4-7 дней), более высокая лучевая нагрузка, неспецифический захват соединений окружающими опухоль тканями (высоким уровнем ложноположительных результатов) [74].

Фрагменты антител. Основными преимуществами фрагментов антител Fab (около 55 кДа) и (Fab)₂ (около 110 кДа) по сравнению с полноразмерными антителами являются их более высокая скорость выведения из организма пациента, что сокращает время от введения до начала исследования; более низкая поглощенная доза и возможность визуализации непосредственно в день или на следующий день после инъекции, что дает возможность использования короткоживущих радиоизотопов [60, 73, 128]. На сегодняшний день единственным препаратом на основе меченных фрагментов антител для детекции

рецептора HER2/neu у больных РМЖ является «⁶⁸Ga-DOTA-F(ab')₂-трастузумаб», использование которого показало его безопасность и аккумуляцию в первичной опухоли у 4 из 8 пациенток с гиперэкспрессией HER2/neu. При этом, накопление РФЛП в HER2-негативных опухолях в ходе проведения исследования выявлено не было [23, 71, 72].

Альтернативные каркасные белки. Для преодоления проблем медленного выведения, иммуногенности и неудовлетворительной связывающей способности был синтезирован новый класс синтетических неиммуноглобулиновых протеинов, получивших название альтернативных каркасных белков (АКБ) или скаффолдов [6, 7]. Основными преимуществами нового поколения связывающих молекул являлись прежде всего их небольшие размеры (4-20 кДа), обеспечивающие быстрое проникновение в опухоль, а также быстрая элиминация из организма и практически полное отсутствие токсичности и нежелательных реакций. В связи с этим, использование АКБ позволяет выполнять визуализацию в день непосредственного введения препарата, что сопровождается более низким радиационным воздействием (в 4-6 раз ниже, чем при выполнении иммуно-ПЭТ) [75, 101].

В настоящее время АКБ разделяются на два типа: соединения размером с домен (domain-sized compounds) (6-20 кДа) и белки с включением ограниченных пептидов (constrained peptides) (2-4 кДа) (таблица 4). Для обоих классов библиотека основных структур обычно составляется путем случайного или целенаправленного мутагенеза исходного каркасного протеина по остаткам, не являющихся существенными для денатурации белка. В связи с этим, специфические мишени для связывания отбираются с помощью фагового/дрожжевого и рибосомного/мессенджерного РНК-дисплея (рисунок 3) [8, 47, 48].

Большое внимание и перспективность молекулярной визуализации привели к внушительному количеству доклинических исследований радиофармпрепаратов на основе тропных к HER2/neu АКБ, меченных

различными изотопами. Несмотря на это, до этапа клинических испытаний дошли лишь соединения на основе молекул аффибоди, адаптов и дарпинов [92].

Таблица 4 – Основные классы альтернативных каркасных протеинов

Название класса АКБ	
Соединения доменного строения	Пептиды с закрепленной структурой
– Аффибоди (Affibody, Inc.); – Альбуминсвязывающие домены, имеющие сродство с протеином (ADAPTs); – Аффилины (Scil Proteins GmbH); – Антикалины (Pierris, Inc.); – Атримеры (Anaphore, Inc.); – Дарпины (Dyax, Inc., Shire Inc.); – FN3 скаффолды (Molecular Partners, Inc.); – Финомерные платформы (Janssen); – Домены типа ингибитора Кунитца или пронектин (Protelica); – Последовательности на основе белка FN3 (Protelica, Inc.)	– Авимеры (Avimers [Avidia, Inc.]) – Бициклические пептиды (Bicycle Therapeutics, Inc.) – Цистеинсодержащие пептиды

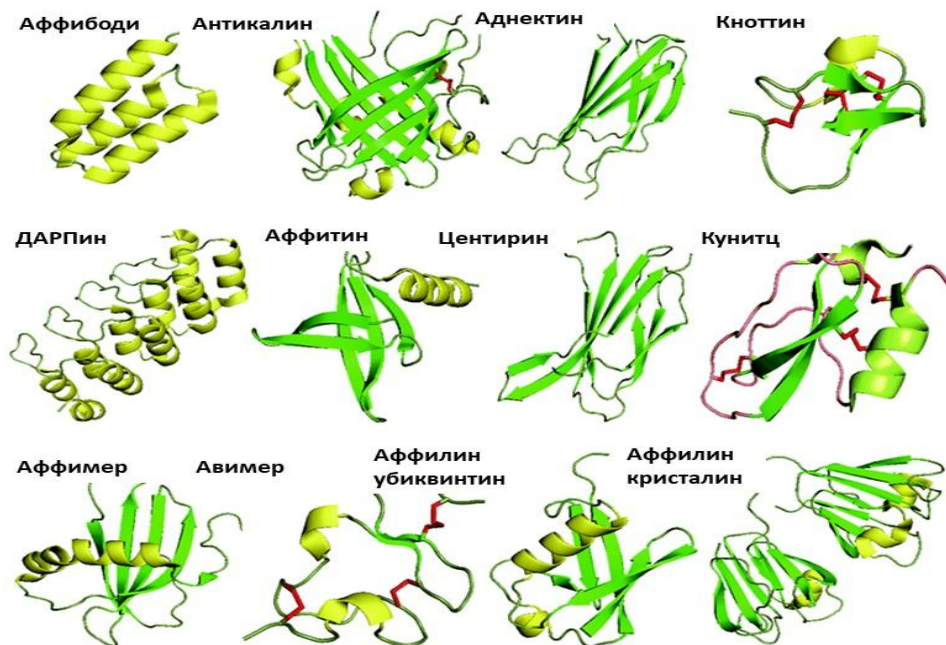


Рисунок 3 – Схематичное изображение ряда альтернативных каркасных белков

Аффибоди. Одним из примеров клинического использования альтернативных каркасных протеинов для диагностики HER2-позитивного рака молочной железы являются молекулы аффибоди, которые представляют собой состоящие из аминокислот три плотно скрученные альфа-спирали [40, 45, 106, 165]. Наибольшее количество исследований по изучению диагностических и терапевтических возможностей аффибоди посвящены HER2-позитивным злокачественным образованиям благодаря их высокой аффинности к рецептору HER2/neu [135, 147, 148, 150].

Пионером в клинических исследованиях у пациентов с РМЖ является меченная ^{111}In и ^{68}Ga молекула ABY-002, использование которой показало безопасность препаратов « ^{111}In -ABY-002» и « ^{68}Ga -ABY-002» и их высокое накопление в печени и почках [20].

Следующей модификацией молекулы аффибоди стало ее преобразование до молекулы II поколения ABY-025, клинические испытания которой по данным Sorensen et al показали безопасность « ^{111}In -ABY-025», а также возможность дифференцировки статуса HER2/neu в опухолевых очагах у больных местно-распространенным и метастатическим РМЖ [133, 134].

Изучение препарата « ^{68}Ga -ABY-025» для ПЭТ/КТ также продемонстрировало его безопасность и выявило оптимальную дозировку протеина для клинического использования у больных РМЖ, равную 427 мкг белка. В дальнейшем применение именно этой дозировки позволило визуализировать все опухолевые очаги в организме исследуемых пациенток, а также определить их статус HER2/neu, что было подтверждено данными ИГХ исследования [120]. Дополнительное исследование препаратов « ^{111}In -ABY-025» и « ^{68}Ga -ABY-025» выявило, что лучшим референсным органом для дифференцировки статуса HER2/neu у больных РМЖ является селезенка, а именно соотношение опухоль/селезенка [119].

Еще одним представителем аффибоди, прошедшим клиническую апробацию, являлся препарат [^{99m}Tc]Tc-ZHER2:41071, безопасность и фармакокинетика которого оценивались у 31 пациентки раком молочной железы, которые были разделены на три подгруппы в зависимости от дозы используемого протеина: 500, 1000 и 1500 мкг. По результатам анализа были продемонстрированы отсутствие нежелательных явлений и нарушений функций жизненно важных органов у всех больных, а также преимущественное накопление соединения в почках и печени. Также при проведении данного анализа была доказана возможность использования [^{99m}Tc]Tc-ZHER2:41071 для разделения первичных опухолей в зависимости от экспрессии HER2/neu при использовании дозировки 1000 мкг через 2 часа после введения ($p < 0,05$, Mann-Whitney test) [26].

ADAPT (ABD-Derived Affinity Proteins). Еще одним протеином, прошедшим клиническое испытание у больных РМЖ, является 46-аминокислотного каркас ADAPT6, синтезированный из складывающегося в трехспиральную структуру альбумин-связывающего домена (АСД) и обладающий высоким сродством к HER2/neu (1 нМ) и быстрым выведением из кровотока в связи с низким связыванием с альбумином [146, 159].

Клиническая апробация препарата [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 продемонстрировала отсутствие нежелательных явлений, а также возможность дифференцировки статуса HER2/neu в первичных опухолях МЖ при использовании значения соотношения опухоль/фон при дозировке протеина 500 мкг через 2 часа после введения ($p < 0,05$, Mann-Whitney test) [27, 28, 30].

1.2.2 Дарпины для детекции рецептора HER2/neu у больных раком молочной железы

Дарпины (DARPin – Designed Ankyrin Repeat Proteins) являются молекулами небольших размеров (14 – 21 кДа), искусственно

синтезированных на основе белков анкиринов [106, 131] и включающих в свой состав 4-6 анкириновых доменов в виде двух альфа-спиралей с бета-поворотом между ними (33 аминокислоты) [70, 80, 131].

Дарпины нашли свое широкое применение в онкологии либо в виде моновалентных соединений, либо в конъюгации с другими веществами (например, с радиоизотопами) [104, 113, 138]. Подобные соединения на этапе доклинических исследований продемонстрировали свою эффективность и высокую специфичность и аффинность к рецептору HER2/neu [125]. Высокая продуктивность работы по синтезу таргетных протеинов лаборатории молекулярной онкологии Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова под руководством академика РАН, доктора биологических наук, профессора С.М. Деева с 2010 года позволила сформировать библиотеки с различными вариациями дарпинов и начать доклинические и клинические исследования [37].

Препарат [^{99m}Tc]Tc-DARPin9_29 является одним из первых препаратов, прошедших клиническую апробацию у человека (рисунок 4). Предшествующие ей данные *in vitro* и *in vivo* анализов показали высокую специфичность и аффинность протеина к рецептору HER2/neu ($\text{KD1} = 439 \pm 156 \text{ нМ}$ и $\text{KD2} = 9,1 \pm 2,7 \text{ нМ}$), а также высокую аккумуляцию соединения в опухолевой ткани лабораторных животных с гиперэкспрессией HER2/neu по сравнению с опухолями с низкой экспрессией ($p < 0,00005$, Mann-Whitney) [114, 155].

Проведенная на базе отделения радионуклидной диагностики и терапии НИИ онкологии Томского НИМЦ I фаза клинических исследований выявила безопасность препарата [^{99m}Tc]Tc-DARPin9_29 и возможность его применения для дифференцировки статуса первичной опухоли у больных раком молочной железы ($p < 0,00005$, Mann-Whitney) [4]. Несмотря на это, высокое накопление соединения в печени превышало допустимые значения

и препятствовало адекватной оценке ее состояния во время важного догоспитального диагностического этапа (рисунок 5) [5].

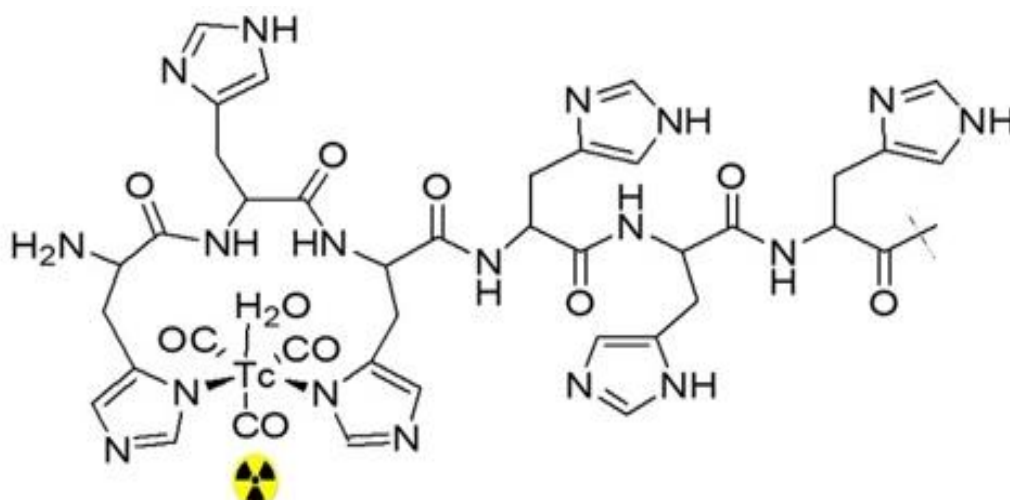


Рисунок 4 – Структура меченной технецием-99m по трикарбонильной методике молекулы DARPin9_29

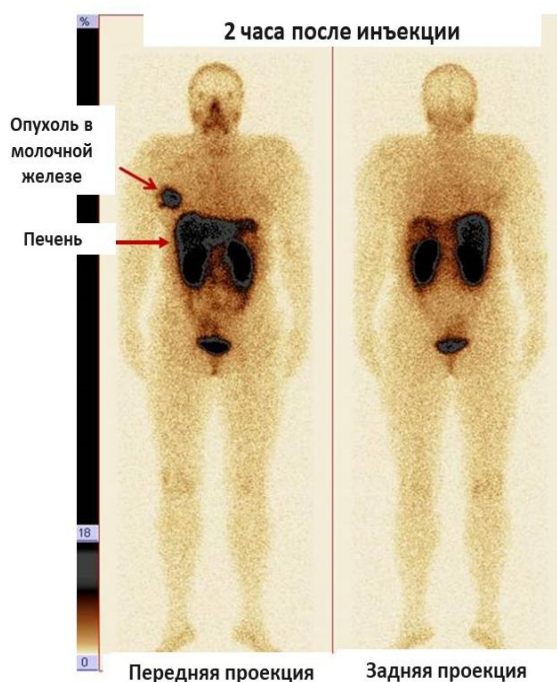


Рисунок 5 – Планарная сцинтиграфия (передняя и задняя проекции) больной раком молочной железы через 2 часа после введения препарата [^{99m}Tc]Tc-DARPin9_29

Следующим этапом являлась модификация соединения, а также выбор оптимального протеина для последующего клинического анализа [37, 79]. В

ходе доклинического анализа препаратов $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-H}_6\text{-G3}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-G3-H}_6$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-(HE)}_3\text{-G3}$ и $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-G3-(HE)}_3$ проводилось изучение возможности влияния расположения (С- или N-конца) и состава (гексагистидин или $(\text{HE})_3$) гистидин-содержащих меток на биораспределение в организме лабораторных животных. Эффективность мечения, стабильность метки, специфичность и сродство связывания с HER2 оценивались параллельно.

По результатам исследования не было обнаружено существенного влияния расположения и состава меток на связывание $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -меченых вариантов с рецептором HER2/neu. Во всех случаях была продемонстрирована специфичность к HER2/neu и сопоставимое поглощение препаратов опухолью в *in vivo* исследованиях. Несмотря на это, соединение $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-(HE)}_3\text{-G3}$ показало более высокие соотношения опухоль/печень, опухоль/легкое, опухоль/кости и опухоль/мышцы, что усилило визуализацию HER2-позитивных опухолей у больных раком молочной железы (рисунок 6) [156].

Выполненная в условиях отделения радионуклидной терапии и диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ I фаза клинических испытаний радиофармацевтического препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-(HE)}_3\text{-G3}$ у больных раком молочной железы продемонстрировала отсутствие нежелательных явлений на этапах динамического наблюдения, быструю элиминацию соединения из организма пациентов, эффективную дозу до 3,4 мЗв при типичной инъецируемой активности в 300 МБк, а также более высокую аккумуляцию препарата в опухолях молочной железы с гиперэкспрессией рецептора HER2/neu (рисунок 7). Вопросы, касающиеся выбора дозировки протеина для дальнейшего клинического использования были затронуты в ходе выполненного исследования лишь частично [28].

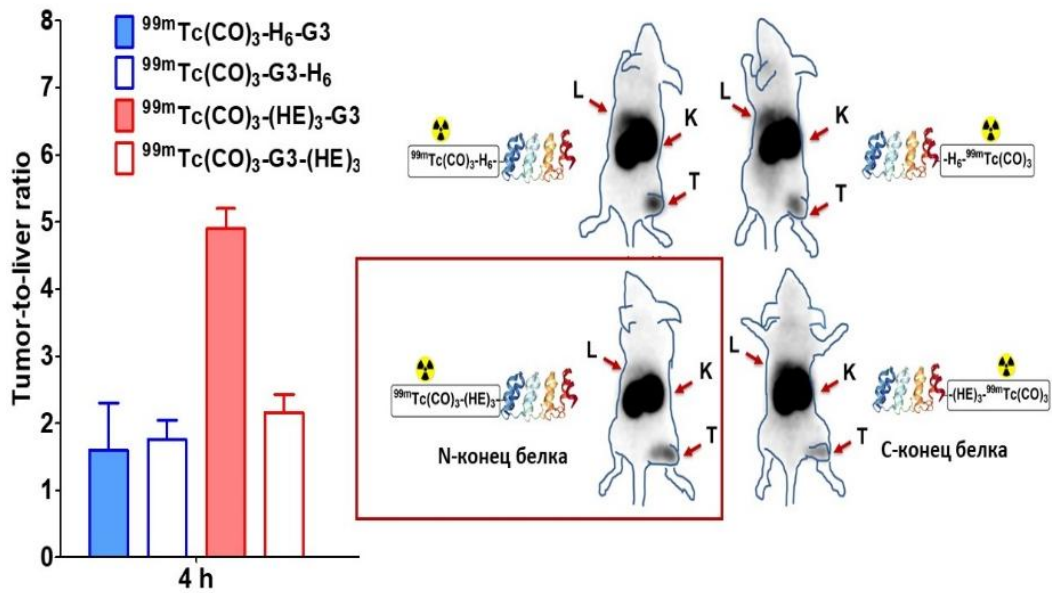


Рисунок 6 – Данные in vivo исследований по накоплению препаратов на основе DARPin(HE)₃-G3 опухоли и печени

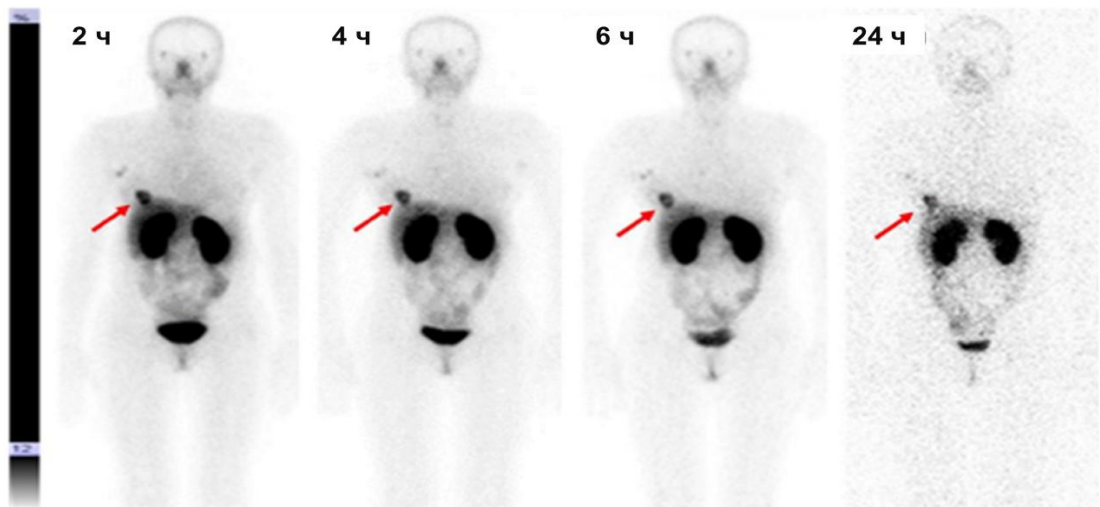


Рисунок 7 – Передняя проекция планарной сцинтиграфии больной РМЖ с гиперэкспрессией рецептора HER2/неу в первичной опухоли через 2, 4, 6 и 24 часов после введения радиофармацевтического лекарственного препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$

1.2.3 Оценка эффективности неоадьювантной терапии HER2-позитивного рака молочной железы с использованием методов молекулярной визуализации

Таргетная терапия является стандартом лечения больных HER2-позитивным раком молочной железы согласно российским и международным клиническим рекомендациям. Использование двойной таргетной блокады трастузумабом и пертузумабом привело к значительному росту показателей полной морфологической регрессии, увеличивая тем самым безрецидивный период и выживаемость данной категории пациенток [11, 12].

Актуальность исследований в отношении поиска предсказательных факторов полной морфологической регрессии у больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu способствовали изучению потенциальных возможностей ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ для определения ответа на предоперационное лечение [49, 83].

Так в открытое мультицентричное, рандомизированное исследование PHERGain было включено 356 больных операбельным HER2-позитивным раком молочной железы с I-IIIА стадией опухолевого процесса, которых разделили на две группы. Первая группа больных ($n = 71$) получала 6 курсов химиотаргетной терапии по схеме доцетаксел + карбоплатин + трастузумаб + пертузумаб (DCHP), вторая – только трастузумаб и пертузумаб ($n = 285$). ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ проводилась в обеих группах до начала лечения, а также через 2 курса терапии. При наличии ответа на лечение больные из второй группы продолжили получать еще 4 курса двойной таргетной блокады; при его отсутствии – больным назначали 4 курса по схеме DCHP. Оценка эффективности лечения в обеих группах выполнялась после хирургического этапа по данным морфологического исследования. По результатам проведенного анализа Perez-Garcia et al продемонстрировали, что проведение ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ позволяло выявлять больных с HER2-

позитивными опухолями с наибольшей эффективностью двойной таргетной блокады без химиотерапии [110].

В исследовании AVATAXHER больным HER2-позитивным раком молочной железы ($n = 152$), получавшим неоадьювантную химио-таргетную терапию, также выполнялось изучение соотношения результатов ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ с данными патоморфологического ответа. В ходе проведенного анализа группой авторов Couter et al была продемонстрирована возможность выявления пациенток, у которых выполнение раннего ПЭТ исследования могло предсказывать отсутствие ответа на неоадьювантную терапию [34].

Полученные результаты представленных выше исследований явились предпосылками для расширения объема и направленности исследований с использованием скаффолдов для предсказания ответа на предоперационную таргетную терапию у больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu. Однако к настоящему моменту было проведено лишь одно клиническое исследование, посвященное подтверждению или отрицанию данной гипотезы. Так в анализе Alhuseinalkhudhur et al была показана возможность раннего метаболического ответа опухолей с гиперэкспрессией HER2/neu на проводимую анти-HER2 терапию при использовании препарата [^{68}Ga]Ga-ABY-025, применение которого может быть использовано в качестве дополнительного диагностического метода [16].

Другие исследования по оценке корреляции накопления радиофармацевтических препаратов на основе альтернативных каркасных протеинов у больных раком молочной железы с эффективностью предоперационного лечения, а также исследования в отношении выживаемости и соотношения с основными клинико-морфологическими параметрами не выполнялись.

1.3 Заключение по обзору литературы

На сегодняшний день проблема анатомической и молекулярной диагностики у больных раком молочной железы остается нерешенной. Особенную актуальность это приобретает на важном догоспитальном этапе, на основании которого формируется индивидуальный для каждого конкретного пациента план локального и системного лечения [53, 76, 102]. Несмотря на всю развитость традиционного арсенала диагностических процедур, до сих пор отсутствует метод, позволяющий одномоментно оценивать анатомическое расположение опухолевых узлов и определять их молекулярно-генетических подтип, что имеет существенное значение прежде всего для больных с местно-распространенным и метастатическим РМЖ [29, 149].

На этом фоне перспективным выглядит относительно новое направление молекулярной визуализации, позволяющее оценивать клеточные и молекулярные маркеры и определять их характеристики уже на ранних стадиях заболевания [46, 136]. При этом, наибольшее предпочтение в данной зоне научно-практического интереса отдается радионуклидной детекции рака молочной железы, развитие которой будет способствовать решению не только проблемы одномоментной анатомической детекции опухолевых очагов в организме больных РМЖ, оптимизируя количество выполняемых на доклиническом этапе диагностических процедур, но и позволит получать информацию о молекулярных особенностях регионарных и отдаленных метастатических узлов, минимизируя при этом выполняемые инвазивные манипуляции [25]. Использование полученной в ходе проведения исследований информации будет иметь особую важность для оптимизации системного компонента терапии и увеличение ее эффективности прежде всего для больных местно-распространенным и метастатическим раком молочной железы, случаях локального и системного

прогрессирования заболевания, а также на этапах системной терапии [67, 136].

Перспективность данного научно-практического направления отображена результатами многочисленных доклинических и клинических исследований, проведенных на базах лидирующих мировых лабораторий и онкологических центров. В частности, результаты молекулярной детекции с использованием меченных различными радиоизотопами альтернативных каркасных протеинов продемонстрировали свою высокую специфичность и аффинность к искомому антигену, а также возможность визуализации опухолевых структур *in vivo* [75, 101].

Анализ различных литературных источников свидетельствует о большей результативности таргетной радионуклидной детекции в отношении рецептора HER2/neu у больных раком молочной железы. Использование направленных радиофармацевтических лекарственных препаратов при данном типе РМЖ к настоящему моменту уже продемонстрировало свою информативность в оценке экспрессии HER2/neu в первичной опухоли и метастатических узлах, а также затронуло вопросы, касающиеся таких проблем, как их анатомическая детекция, межопухолевая и внутриопухолевая гетерогенности, выявление HER2/low подтипа, а также влияние комплекса указанных факторов на молекулярное типирование опухолевых узлов, планирование и выбор объема системного лечения данной категории пациенток [27, 119, 120, 146, 159].

Несмотря на положительные результаты, полученные в ходе исследований с протеинами ADAPT6 и аффибоди, в настоящее время сохраняется необходимость изучения отечественных аналогов АКБ и выбор среди них наиболее эффективной для создания РФЛП молекулы [26, 30]. Так, результаты доклинических и проведенной I фазы клинических исследований радиофармацевтического препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 на основе синтетической молекулы DARPInG3 у больных раком молочной железы продемонстрировали их перспективность [28] и необходимость

расширения объема испытаний. В частности, актуальным является определение дозировки протеина и времени исследования после инъекции [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 для клинического использования, а также определение диагностических критериев для разделения опухолей молочной железы в зависимости от экспрессии HER2/neu.

Изменение парадигм в отношении эффективности таргетных препаратов (использование трастузумаба дерукстекана) в опухолях молочной железы с низкими значениями рецептора HER2/neu [41], а также в отношении бинарного подхода оценки его экспрессии, в частности, способствовало увеличению интереса к возможной эффективности таргетной радионуклидной терапии в аспекте тераностического подхода [18, 33, 36]. При этом, при смене диагностического этапа на терапевтический важным будет определение категории пациентов с различной экспрессией HER2/neu, у которых можно ожидать наибольший эффект от проводимого лечения. В связи с этим, актуальным также является изучение корреляции накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с основными клинικο-морфологическими параметрами, эффективностью предоперационного лечения и показателями выживаемости, что будет способствовать усилению понимания биологических процессов, а также выделению групп пациентов с потенциальной выгодой от таргетной радионуклидной терапии.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В плане подготовки было получено одобрение биоэтического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 4 от 24.04.2021), оформлены протоколы совместных исследований с отделениями общей онкологии, химиотерапии и общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. Согласно Федеральному закону от 12.04.2010 №61-ФЗ (ред. от 29.12.2015) «Об обращении лекарственных средств» и приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации №1218н от 12.11.2020 «Об утверждении порядка изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов непосредственно в медицинских организациях» радиофармацевтические лекарственные препараты, изготовленные непосредственно в медицинских организациях в порядке, установленном уполномоченным федеральным органом исполнительной власти, не подлежат государственной регистрации» исследования с использованием радиофармпрепаратов для диагностики HER2-позитивных опухолей молочной железы получили одобрение приказом НИИ онкологии Томского НИМЦ № 24-п от 19.02.2018. Все пациенты перед введением препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 подписывали информированное согласие.

Набор клинического материала осуществлялся на базе отделений консультативно-госпитального приема НИИ онкологии Томского НИМЦ, планирование дизайна исследования, статистическая обработка и анализ полученных результатов осуществлялись на базе отделения лекарственного лечения опухолей Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

2.1 Дизайн исследования

В исследование было включено 50 больных раком молочной железы (сT2-4сN0-3сM0-1) с положительной и отрицательной экспрессией HER2/neu в первичной опухоли молочной железы до начала локального/системного лечения, проходивших обследование и лечение в период с 2020-2023 гг. Дизайн исследования состоял из 2 этапов и представлен на рисунке 8.

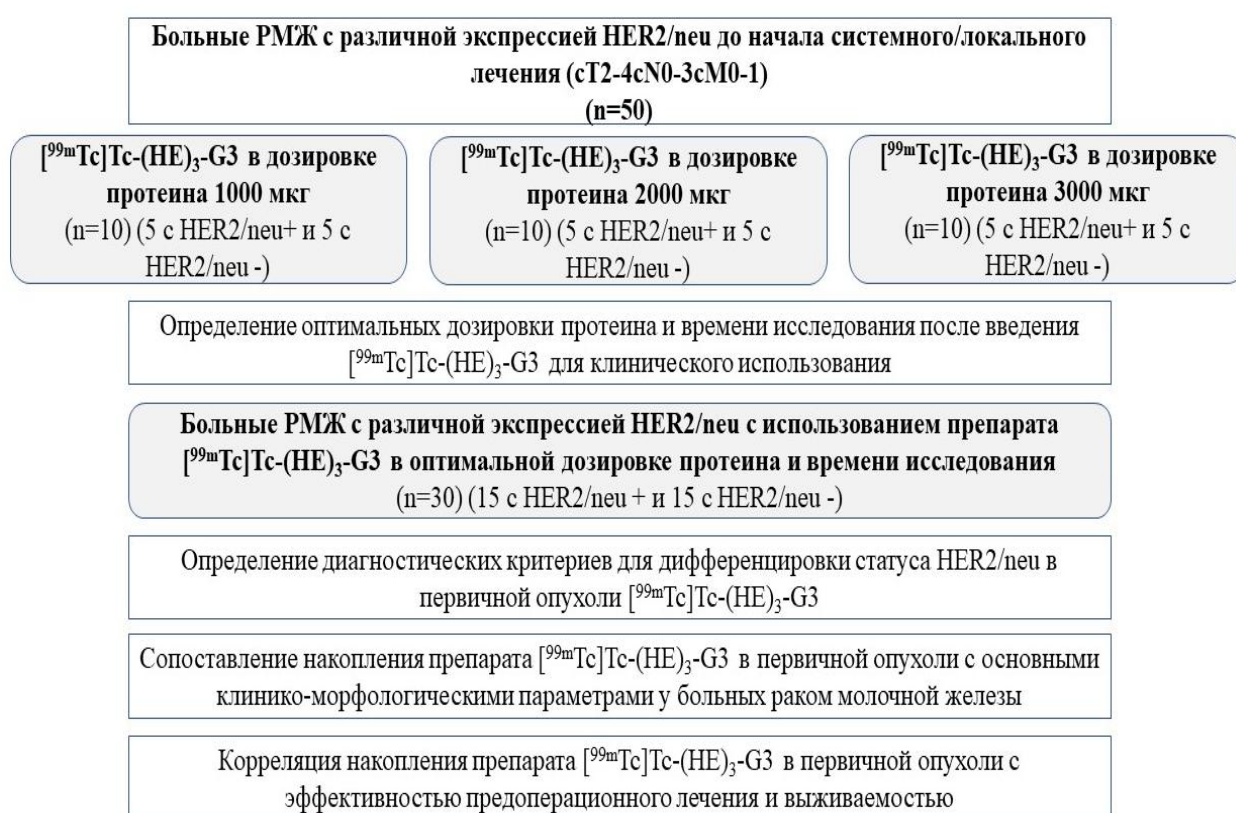


Рисунок 8 – Дизайн исследования

Первый этап исследования включал 30 больных раком молочной железы, которые были разделены на 3 группы в зависимости от используемых дозировок протеина DARPin(HE)₃-G3, равных 1000 мкг, 2000 мкг и 3000 мкг (в каждой группе у 5 пациенток была выявлена положительная экспрессия HER2/neu, у 5 – отрицательная). Проводилось определение оптимальных дозировки протеина и интервал времени после

введения препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 для последующих клинических испытаний.

На втором этапе в подгруппу с определенными на предыдущем этапе дозировкой протеина и времени исследования дополнительно были включены 20 больных раком молочной железы (суммарно 15 пациенток с положительной экспрессией HER2/neu и 15 – с отрицательной). В рамках второго этапа выполнялись определение диагностических критериев для дифференцировки статуса HER2/neu в первичной опухоли у больных раком молочной железы при использовании препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3, а также корреляция его аккумуляции с основными клинико-морфологическими параметрами, эффективностью предоперационного лечения и показателями выживаемости.

2.2 Характеристика клинического материала

Критерии включения и исключения пациенток в исследование были стандартными и представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Критерии включения и исключения больных раком молочной железы в исследование с радиофармацевтическим препаратом [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3

Критерии включения	Критерии исключения
– Возраст старше 18 лет; – Морфологически диагноз рака молочной железы T$_{2-4}$N$_{0-3}$M$_{0-1}$; – Наличие результатов определения статуса HER2/neu первичной опухоли (данные ИГХ и/или FISH-анализа). – Оценка гематологических, почечных и печеночных показателей: - количество лейкоцитов > 4,0 · 10^9/л; - гемоглобин > 100 г/л; - количество тромбоцитов > 180,0.	– Отказ пациентки от исследования; – Тяжелое состояние пациентки; – Клаустрофобия; – Беременность; – Вторая локализация опухолевого процесса; – Аутоиммунное заболевание в активной фазе или аутоиммунное заболевание в анамнезе; – Подтвержденная ВИЧ-инфекция или гепатиты В и С.

Критерии включения	Критерии исключения
$10^9/\text{л}$; - АСТ, АЛТ, щелочная фосфатаза крови в пределах нормальных показателей; - билирубин в пределах нормальных показателей; - креатинин крови в пределах нормальных показателей; – Отрицательный тест на беременность у всех пациенток в репродуктивном возрасте; – Общее состояние больных с оценкой по системе ECOG ВОЗ 0 – 2 балла; – Возможность прохождения пациенткой всех диагностических манипуляций, планируемых в исследовании; – Подписанное информированное согласие пациента	– Начало таргетной анти-HER2/neu терапии до проведения исследования

Характеристика больных раком молочной железы I этапа исследования представлена в таблице 6. В группе преобладали пациентки возрастной группы 45 лет и старше (средний возраст больных $46,5 \pm 10,2$ лет) (53 %) с сохраненной менструальной функцией (77 %), без поражения регионарных лимфатических узлов (63 %) и ПА стадией опухолевого процесса (63 %). Помимо этого, наиболее частым молекулярно-биологическим фенотипом у вошедших в исследование пациентов являлся Люминальный В HER2-позитивный рак молочной железы (38 %).

Таблица 6 – Распределение больных раком молочной железы I этапа исследования с препаратом [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3

Критерии оценки	Абсолютное количество больных (n)	Относительное количество больных (%)
Возраст		
• ≤ 44 лет	14	47
• ≥ 45	16	53
Средний возраст больных $46,5 \pm 10,2$ лет		
Состояние менструальной функции		
• Сохранена	20	77
• Менопауза	10	33
Состояние регионарных лимфатических узлов		
• Отсутствие поражения лимфатических узлов (cN0)	19	63
• Поражение регионарных л/у (cN1-3)	11	27
Стадия опухолевого процесса		
• IIA (T $_2$ N $_0$ M $_0$)	19	63
• Другие стадии (IIB, III, IV)	11	27
Молекулярно-биологический тип рака молочной железы		
• Люминальный A тип	4	13
• Люминальный B тип (HER2-отрицательный)	7	23
• Люминальный B (HER2-положительный)	11	38
• HER2-положительный (не люминальный)	4	13
• Трижды негативный	4	13

Характеристика больных раком молочной железы 2 этапа исследования представлена в таблице 7. Среди пациенток преобладали больные в возрастной группе 45 лет и старше (средний возраст больных $49,3 \pm 11,4$ лет) (77 %) с сохраненной менструальной функцией (57 %), без вовлечения в процесс регионарных лимфатических узлов (76 %) и IIA стадией опухолевого процесса (76 %).

Положительная экспрессия рецептора эстрогена отмечалась у 63 % пациенток, отрицательная – у 37 %. Значения маркера клеточной пролиферации Ki67 менее 20 % отмечались в 20 % случаев, 20 и более % – в 80 %. При анализе иммуногистохимических характеристик преобладал Люминальный В HER2-позитивный молекулярно-биологический подтип рака молочной железы (30 %).

Все пациенты, вошедшие во II этап настоящего клинического наблюдения после этапа комбинированного лечения, находились на динамическом наблюдении. У 12 (40 %) пациенток отмечалось прогрессирование заболевания: в 2 (17 %) случаях – локорегионарный рецидив и в 10 (83 %) – отдаленные метастазы в висцеральные органы (50 %) и кости (50 %).

Таблица 7 – Распределение больных раком молочной железы II этапа исследования с препаратом [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3

Критерии оценки	Абсолютное количество больных (n)	Относительное количество больных (%)
Возраст		
• ≤ 44 лет	10	33
• ≥ 45	20	77
Средний возраст больных $49,3 \pm 11,4$ лет		
Состояние менструальной функции		
• Сохранена	17	57
• Менопауза	13	43
Состояние регионарных лимфатических узлов		
• Отсутствие поражения лимфатических узлов (cN0)	23	76
• Поражение регионарных л/у (cN1-3)	7	24
Стадия опухолевого процесса		
• IIA (T ₂ N ₀ M ₀)	23	76
• Другие стадии (IIB, III, IV)	7	24

Критерии оценки	Абсолютное количество больных (n)	Относительное количество больных (%)
Экспрессия рецепторов эстрогена - РЭ+ (положительный статус) - РЭ- (отрицательный статус)	19 11	63 37
Маркер клеточной пролиферации Ki67 ≤ 20% 20-30% ≥ 30%	6 8 16	20 27 53
Молекулярно-биологический тип рака молочной железы - Люминальный А тип - Люминальный В тип (HER2-отрицательный) - Люминальный В (HER2-положительный) - HER2-положительный (не люминальный) - Трижды негативный	3 7 9 6 5	10 23 30 20 17
Прогрессирование заболевания - Да - Нет	12 18	40 60
Характер прогрессирования - Локорегионарный рецидив - Отдаленные метастазы	2 10	17 83
Локализация отдаленных метастазов - Легкие/печень - Кости	5 5	50 50
Количество пациентов, получавших НАХТ - Да - Нет	23 7	77 33
Полные морфологические регрессии - pCR - non-pCR	9 14	30 70

Проведение неoadъювантной химиотерапии. Всем больным с гиперэкспрессией HER2/neu и с тройным отрицательным фенотипом в

первичной опухоли на первом этапе комбинированного лечения согласно Российским клиническим рекомендациям проводилось предоперационное системное лечение [11, 12]. Помимо этого, согласно клинической ситуации в 3 случаях Люминального В HER2-отрицательного рака также проводились курсы неоадьювантной терапии. Схемы предоперационной терапии у больных раком молочной железы представлены в таблице 8.

У 9 (30 %) больных после проведения предоперационного лечения отмечалась полная морфологическая регрессия (pCR), у 14 (70 %) пациенток – остаточная опухоль (non-pCR).

Таблица 8 – Схемы предоперационного лечения больных раком молочной железы II этапа исследования с препаратом [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3

Подтип опухоли	Схемы лечения
HER2- позитивный подтип	• 6 циклов DCH (доцетаксел 75 мг/ м² в/в в 1-й день 1 раз в 3 нед. + карбоплатин AUC6 в/в в 1-й день 1 раз в 3 нед. + трастузумаб 6 мг/кг (нагрузочная доза 8 мг/кг) в/в в 1-й день 1 раз в 3 нед.); • 6 циклов DCHP (доцетаксел 75 мг/ м² в/в в 1-й день 1 раз в 3 нед. + карбоплатин AUC6 в/в в 1-й день 1 раз в 3 нед. + трастузумаб 6 мг/кг (нагрузочная доза 8 мг/кг) в/в в 1-й день 1 раз в 3 нед. + пертузумаб 420 мг (нагрузочная доза 840 мг) в/в в 1-й день 1 раз в 3 нед.)
Трижды негативный рак	• 4 цикла AC (доксорубин 60 мг/м² в/в в 1-й день + циклофосфамид 600 мг/м² в/в в 1-й день) 1 раз в 2 нед.; 12 введений паклитаксела (80 мг/м² в/в еженедельно); • 4 цикла AC (доксорубин 60 мг/м² в/в в 1-й день + циклофосфамид 600 мг/м² в/в в 1-й день) 1 раз в 2 нед.; паклитаксел 12 введений (80 мг/м² в/в + карбоплатин AUC2 в/в еженедельно)
Люминальный В HER2- негативный подтип	• 4 цикла AC (доксорубин 60 мг/м² в/в в 1-й день + циклофосфамид 600 мг/м² в/в в 1-й день) 1 раз в 3 нед.; 4 цикла доцетаксел (75 мг/м² в/в в 1-й день 1 раз в 3 нед.)

Хирургическое лечение. Всем больным раком молочной железы, получавшим предоперационную терапию, выполнялась установка локализационной метки в первичную опухоль для мониторинга эффективности проводимого лечения и в качестве ориентира для последующих хирургического и морфологического этапов.

Объем хирургического вмешательства определялся согласно клинической ситуации. Пациенткам выполнялись радикальная мастэктомия, секторальная резекция с аксиллярной лимфаденэктомией/биопсией сторожевых лимфатических узлов и онкопластические операции в различном объеме.

Послеоперационное локальное (лучевая терапия) и системное лечение (гормональная терапия, химиотерапия и таргетная терапия) назначались по показаниям.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Приготовление радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3

Наработка протеина. Нарботка протеина DARPin(HE)₃-G3 выполнялась в бактериальном продуценте в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУН Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством академика РАН, проф. С.М. Деева. Последовательность аминокислотных остатков, представленных в протеине, была следующая:
MRGSHEHEHEGSDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANG
ADVNAKEYGLTPYLATAHGHLEIVEVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAA
FIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQKLN.
Молекулярная масса молекулы составила 18160,29 г/моль.

Приготовление препарата. Приготовление препарата и проведение клинического исследования проводилось на базе отделения радионуклидной терапии и диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ. Для приготовления радиофармацевтического лекарственного препарата использовались три дозировки протеина DARPin(HE)₃-G3, равные 1000, 2000 и 3000 мкг. Мечение проводилось по трикарбонильной методике непосредственно перед введением (рисунок 8) [82, 106].

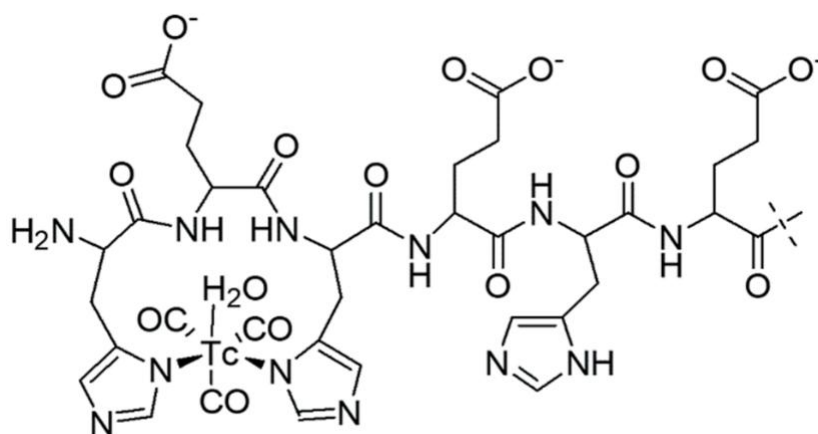


Рисунок 9 – Химическая структура препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3

Состав набора для приготовления трикарбонильного технеция «CRS Isolink» (Center for Radiopharmaceutical Science, Paul Scherrer Institute, Villigen, Швейцария) был представлен натрием тетраборатом декагидратом (2,9 мг), натрием карбонатом (7,8 мг), динатрием боранокarbonатом (4,5 мг) и калием натрием тартратом тетрагидратом 9,0 мг [132]. Технеций-99m был получен в виде пертехнетата путем элюирования генератора ГТ-4к (АО «НИФХИ» имени Л.Я. Карпова) для клинических исследований.

Готовый препарат [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 проходил очищение с использованием методики эксклюзионной хроматографии с предварительным измерением *радиохимического выхода*. Для хроматографии применялись стерилизованные колонки NAP-5 (Sephadex G-25, GE, Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США), подготовленные, уравновешенные и элюированные стерильным натрий-фосфатным буфером. Отбирали 2 мкл соединения для анализа pH и *радиохимической чистоты*.

pH лекарственного средства определяли с помощью тест-полосок для определения pH. Анализ радиохимических выхода и чистоты осуществляли с помощью мгновенной тонкослойной хроматографии (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). Очищенную фракцию доводили до объема 10 мл с помощью стерильного изотонического раствора NaCl и внутривенно вводили пациентам.

Средняя введенная активность радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 соответствовала значению 287 ± 170 МБк. Радиохимический выход составил 83 ± 9 %, радиохимическая чистота – 98 ± 8 %.

2.3.2 Догоспитальное клинико-инструментальное обследование

На догоспитальном этапе всем пациенткам проводилось полное клинико-инструментальное обследование согласно клиническим рекомендациям Министерства Здравоохранения Российской Федерации (таблица 9) [11, 12].

Распределение больных раком молочной железы по возрасту проходило согласно рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) с выделением пациенток молодого (18 – 44 года) и старшего возраста 45 лет и более.

Распространенность заболевания (стадирование) оценивалась по международной классификации TNM (The TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition, 2017) до начала лечения согласно клинико-инструментальному и морфологическому обследованию. Размер первичного опухолевого узла определялся по данным ультразвукового исследования в наибольшем измерении.

По состоянию регионарных лимфатических узлов все больные были распределены согласно клинической классификации (cN) (Российские клинические рекомендации, 2024 года) [11, 12]. Состояние отдаленных

органов и тканей оценивалось по данным инструментальных методов диагностики.

Распределение больных в зависимости от молекулярно-биологического подтипа осуществлялось согласно классификации, представленной в таблице 1.

Динамическое наблюдение за пациентами после этапа комбинированного лечения проводилось в интервалах и объеме, указанных в Российских клинических рекомендациях.

Таблица 9 – Обследования больных раком молочной железы согласно Российским клиническим рекомендациям

Лабораторные исследования	Инструментальные исследования	Морфологические исследования
– Анализ крови (общий анализ крови, биохимический анализ крови, исследование свертывающей системы крови) – Общий анализ мочи	– Билатеральная маммография – Ультразвуковое исследование молочных желез, регионарных лимфатических узлов и печени – Компьютерная томография органов грудной клетки – Остеосцинтиграфия – Компьютерная томография органов брюшной полости и малого таза по показаниям – Магнитно-резонансная томография головного мозга и молочных желез по показаниям	– Гистологическое исследование опухолевой ткани первичной опухоли молочной железы – ИГХ исследование опухолевой ткани первичной опухоли молочной железы – FISH анализ по показаниям (HER2/neu по ИГХ 2+) – Цитологическая и/или морфологическая верификация метастазов в регионарные лимфатические узлы

2.3.3 Морфологические методы исследования

Морфологическое исследование. У всех больных проводился анализ биопсийного материала первичной опухоли молочной железы по стандартной методике на базе отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Гистологическое исследование выполнялось с применением светового микроскопа Carl Zeiss Axio Lab.A1 (Германия), диагноз рака молочной железы устанавливался согласно «Гистологической классификации опухолей молочной железы» (ВОЗ, 2012). Подтверждение метастатического поражения регионарных лимфатических узлов выполнялось с помощью анализа цитологического или морфологического материала.

Иммуногистохимическое исследование биопсийного материала выполнялось по стандартной методике с оценкой экспрессии рецепторов эстрогена (РЭ), рецепторов прогестерона (РП), рецептора HER2/neu, а также маркера клеточной пролиферации Ki67. Для этой цели применялись антитела фирмы Dako к онкопротеину c-erbB-2 (рабочее разведение 1:500, кроличьи), к рецепторам эстрогена (клон 1D5, RTU, мышинные), прогестерона (клон PgR 636, RTU, мышинные) и к Ki-67 (клон MIB-1, RTU, мышинные).

HER2-статус оценивался в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP от 2023 года, согласно которым отрицательной экспрессия HER2/neu считается при отсутствии окрашивания или со слабым, прерывистым мембранным окрашиванием (0 и 1+), положительной – случаи с периферическим мембранным полным интенсивным окрашиванием более 10 % опухолевых клеток (3+). В сомнительных случаях (2+) результат будет подтверждаться амплификацией гена HER2 методом гибридизации in situ (FISH) с использованием ДНК-зонда ERBB2(17q12)/SE17 (Kreatech, США). [163].

Оценка экспрессии РЭ и РП выполнялась количественным методом гистосчета (Histo-Score). При этом подсчитывался процент позитивных клеток и показатель экспрессии в баллах. Для маркера клеточной пролиферации Ki67 оценивался уровень экспрессии: к низкому уровню относились показатели менее 20 %, к высокому – 20 % и более.

Оценка патоморфологического ответа опухоли на предоперационное лечение. Оценка степени лечебного патоморфоза проводилась по системе «*Residual Cancer Burden*» (RCB) с исследованием микроскопических размеров ложа опухоли, выраженности инвазивного компонента опухоли в процентах от общей площади ложа опухоли, выраженности карциномы *in situ* (CIS) в процентах от общей площади ложа опухоли, числа лимфатических узлов с метастазами и наибольшего диаметра метастаза в лимфатическом узле [2]. Для расчета значения индекса RCB применялась формула $(RCB=1,4(f_{inv}d_{prim})^{0,17} + [4(1 - 0,75^{LN}) d]^{0,1} d_{prim}=\sqrt{d_1d_2})$ или бесплатный онлайн калькулятор. Результатом вычислений являлся класс остаточной опухоли (остаточная опухолевая нагрузка), ранжированный от 0 до III:

RCB 0 (pCR, полный патоморфологический ответ) – значение индекса 0;

RCB I (минимальная остаточная опухоль) – значение индекса менее 1,36, низкий риск прогрессирования заболевания;

RCB II (умеренная остаточная опухоль) – значение индекса 1,36—3,28, промежуточный риск прогрессирования заболевания;

RCB III (выраженная остаточная опухоль) – значение индекса более 3,28, высокий риск прогрессирования заболевания.

2.3.4 Радионуклидные методы исследования

У всех больных раком молочной железы выполнялась однофотонная эмиссионная компьютерная томография с использованием препарата

$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$. На первом этапе исследование проводилось через 2, 4 и 6 часов после внутривенного введения препарата, на втором – через оптимальный временной интервал, определенный на первом этапе.

Анализ выполнялся на гамма-камере E.CAM 180 фирмы Siemens (Германия) с использованием параллельных высокоразрешающих коллиматоров для энергии 140 кэВ со скоростью сканирования 12 см/мин, запись исследования производилась на матрицу 256×1024 пикселей без аппаратного увеличения по стандартному протоколу исследования. Исследование выполнялось в положении лежа на спине с заведенными за голову руками, в поле зрения детектора входили голова, шея, аксиллярная область и грудная клетка до уровня бифуркации трахеи и верхний этаж брюшной полости. Запись выполнялась в 32 проекциях (каждая проекция по 30 с) в матрицу 64×64 пикселя без аппаратного увеличения, после чего определялись временные интервалы и оптимальные параметры для исследований в основных группах пациентов с целью оценки диагностической эффективности метода.

Для оценки накопления $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ при ОФЭКТ использовался объем $3,5 \text{ см}^3$ (volume of interest, VOI), который был очерчен на томограммах с центром на самом высоком уровне поглощения опухолью. Для достижения количественного счета данный объем копировался в проекцию зон интереса, числовые значения выражались в импульсах.

При анализе данных ОФЭКТ на первом этапе оценивалось накопление радиофармпрепарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в первичной опухоли молочной железы и печени у больных раком молочной железы через 2, 4 и 6 часов после введения. Дополнительно определялись оптимальные дозировка соединения и время исследования. Данные по аккумуляции соединения представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Накопление (импульсы) радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных раком молочной железы в различных дозировках протеина через 2, 4 и 6 часов после введения

№	HER2	Опухоль 2ч	Печень 2ч	Опухоль 4ч	Печень 4ч	Опухоль 6ч	Печень 6ч
<i>1000 мкг</i>							
1	-	306	2240	523	2237	357	1031
2	+	1266	2245	1182	3713	594	1459
3	+	2565	3854	2144	2997	1827	2453
4	+	1303	3502	886	2425	746	1767
5	+	4338	5002	4033	6411	4091	6411
6	-	522	1995	514	1689	241	1606
7	-	411	1612	318	944	144	739
8	-	1802	3070	1129	2137	782	713
9	+	1977	1296	1509	1019	1509	803
10	-	398	2581	341	2471	282	1139
<i>2000 мкг</i>							
11	+	1088	1159	1003	468	790	1031
12	+	1886	3013	1563	2057	1166	1459
13	-	1822	2886	1667	2434	1495	2453
14	-	705	1188	518	727	529	1767
15	+	718	1076	662	583	441	6411
16	-	634	1782	517	1051	417	1606
17	-	793	2341	541	1615	452	739
18	+	2022	1188	1321	921	1473	713
19	+	4952	3561	4952	2600	4952	803
20	-	1856	4743	1116	2199	1012	1139
<i>3000 мкг</i>							
21	+	8713	2400	10715	1708	7035	1417
22	-	680	681	786	557	446	522
23	-	4121	5778	2548	2833	1534	2236
24	+	6444	4669	5014	4886	3513	4243
25	+	6176	6725	5653	6725	4970	4641
26	-	3989	4971	2520	2769	1856	2139
27	+	16542	4526	14365	4075	9342	3671
28	+	2695	6293	2532	4978	2047	3627
29	-	923	1159	523	824	376	492
30	-	733	1266	835	1060	539	255

На втором этапе с использованием оптимальной дозировки протеина и времени проведения исследования после введения препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3, анализировались его накопление в опухоль, контралатеральный участок противоположной молочной железы (фон), печень и широчайшую мышцу спины (ШМС), также определялись соотношения опухоль/фон, опухоль/печень и опухоль/ШМС. Выбор референсных органов основывался на результатах клинических исследований других каркасных протеинов, где большая информативность была получена при использовании параметров накопления препарата в печени и широчайшей мышце спины [119, 120]. Данные по аккумуляции препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных раком молочной железы на втором этапе исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Параметры накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в дозировке протеина 3000 мкг через 4 часа после инъекции у больных раком молочной железы

№	HER2	Опухоль	Фон	ШМС	Печень	О/фон	О/ШМС	О/печень
1	HER2+	10715	612	310	1708	17,51	34,56	6,27
2	HER2-	786	95	42	557	8,27	18,71	1,41
3	HER2-	2548	1382	703	2833	1,84	3,62	0,89
4	HER2+	5014	399	471	4886	12,57	10,65	1,03
5	HER2+	5653	428	627	6725	13,21	9,02	0,84
6	HER2-	2520	1029	878	2769	2,45	2,87	0,91
7	HER2+	14365	389	295	4075	36,93	48,69	3,53
8	HER2+	2532	188	398	4978	13,47	6,36	0,51
9	HER2-	523	67	74	824	7,81	7,07	0,63
10	HER2-	835	450	193	1060	1,86	4,33	0,79
11	HER2+	2014	328	52	873	6,14	38,74	2,31
12	HER2+	3562	427	134	1842	8,34	26,58	1,93
13	HER2+	2664	272	118	982	9,79	22,58	2,71
14	HER2-	1654	269	61	2051	6,15	27,11	0,81
15	HER2-	718	151	49	869	4,75	14,65	0,83
16	HER2+	5853	327	343	2029	17,89	17,06	2,88
17	HER2-	842	176	61	1009	4,78	13,80	0,83
18	HER2-	1539	881	81	1656	1,75	19	0,93
19	HER2+	8036	298	397	2871	26,97	20,24	2,79

№	HER2	Опухоль	Фон	ШМС	Печень	О/фон	О/ШМС	О/печень
20	HER2-	1382	205	96	1285	6,74	14,39	1,08
21	HER2+	2014	328	52	873	6,14	38,73	2,31
22	HER2+	3562	427	134	1842	8,34	26,58	1,93
23	HER2+	2664	272	118	982	9,79	22,58	2,71
24	HER2+	5853	327	343	2029	17,89	17,06	2,88
25	HER2+	8036	298	397	2871	26,97	20,24	2,8
26	HER2-	1654	269	61	2051	6,15	27,11	0,81
27	HER2-	718	151	49	869	4,75	14,65	0,83
28	HER2-	842	176	61	1009	4,78	13,8	0,83
29	HER2-	1539	881	81	1656	1,75	19	0,93
30	HER2-	1382	205	96	1285	6,74	14,4	1,08

2.4 Статистическая обработка результатов

В выполненной работе для статистической обработки результатов исследования применялись программы IBM SPSS Statistics v.20.0 и Statistica 10.0. Нормальность распределения количественных показателей проверяли с применением критерия Шапиро-Уилка. Поскольку данные не соответствовали нормальному распределению, для сравнения независимых групп использовали непараметрические методы: критерии Манна-Уитни (при сравнении двух групп) и Краскела-Уоллиса (при сравнении трёх и более групп). Результаты представлены в формате медианы (Me) с указанием 25-го (Q1) и 75-го (Q3) квартилей. Прогностическая ценность параметров анализировалась с построением ROC-кривых. Оценку выживаемости проводили методом Каплана-Майера, для сравнения кривых выживаемости использовали лог-ранговый критерий. Во всех видах анализа порогом статистической значимости служило значение $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Анализ накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в первичной опухоли и печени у больных раком молочной железы в различные временные интервалы

Накопление препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в первичной опухоли. При использовании радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 визуализация опухолей молочной железы была выявлена во всех случаях, независимо от используемой дозировки протеина и статуса HER2/neu. При этом, накопление радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в первичной опухоли молочной железы имело более высокие значения у больных с гиперэкспрессией HER2/neu при использовании всех трех дозировок меченного протеина ($p < 0,05$, Mann-Whitney test). При этом, более значимая разница в накоплении изучаемого РФЛП в опухолях молочной железы с положительной и отрицательной экспрессии HER2/neu была выявлена при использовании протеина в дозировке 3000 мкг и времени исследования 4 часа после введения ($p = 0,0243$, Mann-Whitney test) (рисунки 10, 11, 12).

Накопление препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в печени. Более низкие показатели (минимальные значения) аккумуляции радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в печени были получены при использовании дозировки протеина 3000 мкг (рисунок 11). Дополнительный статистический анализ выявил, что возможность разделения опухолей молочной железы в зависимости от экспрессии HER2/neu, основываясь на данных по накоплению РФЛП в печени, с наибольшей достоверностью осуществима также при использовании дозировки протеина 3000 мкг через 4 часа после введения ($p = 0,011$, Mann-Whitney test) (рисунки 13, 14, 15).

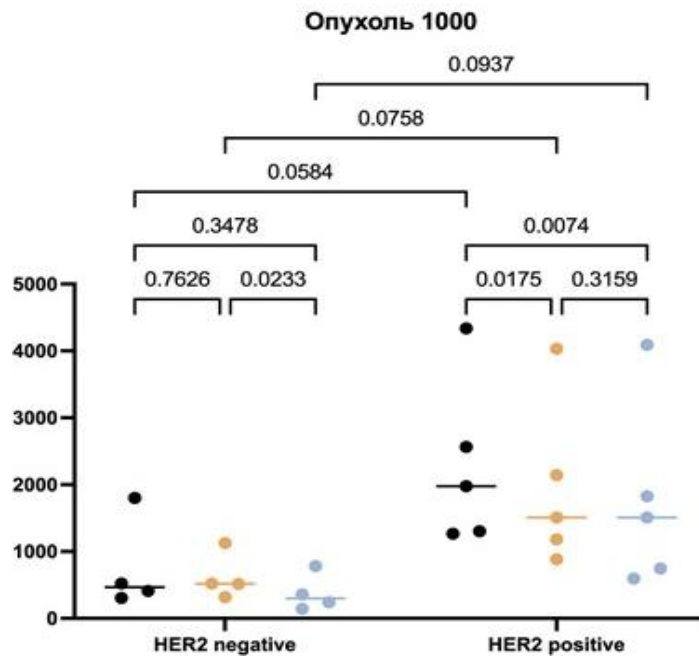


Рисунок 10 – Аккумуляция препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в первичной опухоли больных раком молочной железы в дозировке протеина 1000 мкг через 2, 4 и 6 часов после введения (числовые значения выражаются в импульсах)

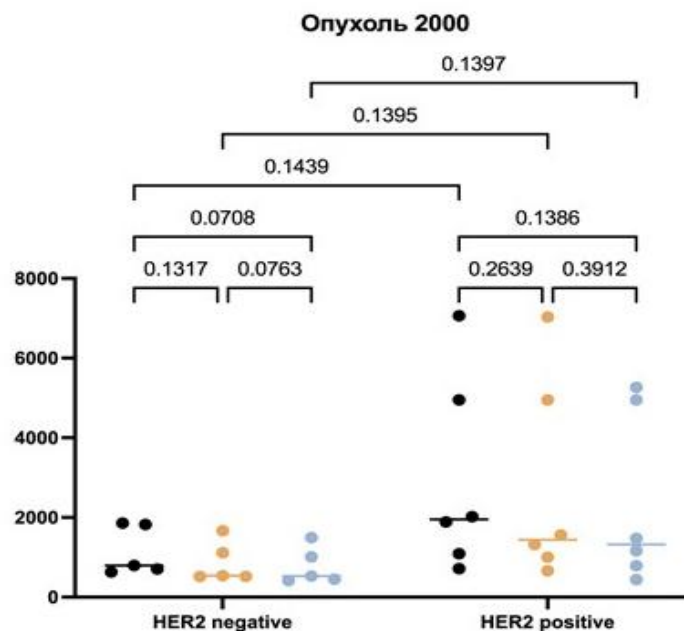


Рисунок 11 – Аккумуляция препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в первичной опухоли больных раком молочной железы в дозировке протеина 2000 мкг через 2, 4 и 6 часов после введения (числовые значения выражаются в импульсах)

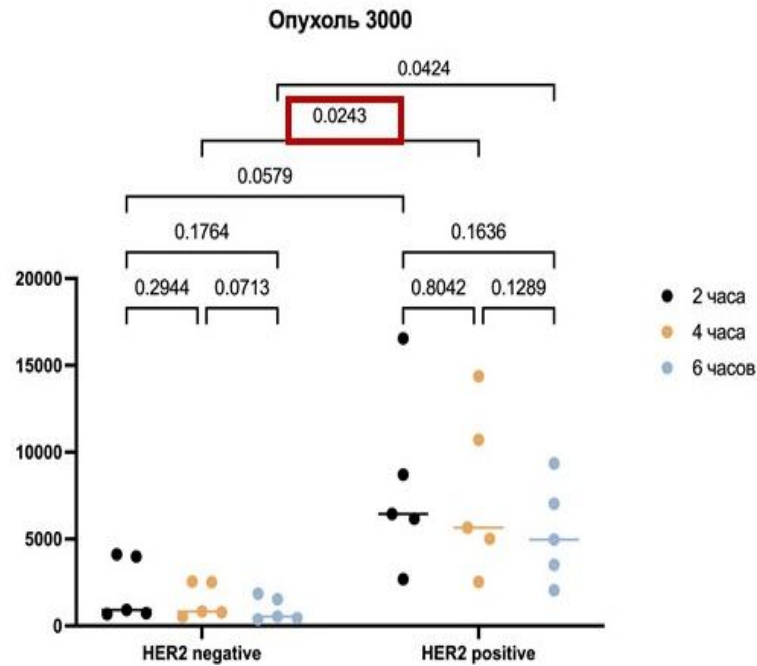


Рисунок 12 – Аккумуляция препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в первичной опухоли больных раком молочной железы в дозировке протеина 3000 мкг через 2, 4 и 6 часов после введения (числовые значения выражаются в импульсах)

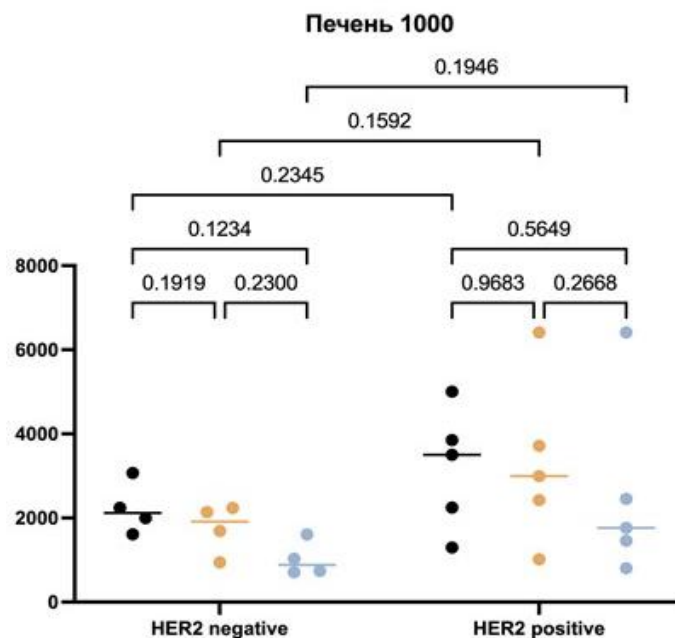


Рисунок 13 – Аккумуляция препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в печени у больных раком молочной железы в дозировке протеина 1000 мкг через 2, 4 и 6 часов после введения

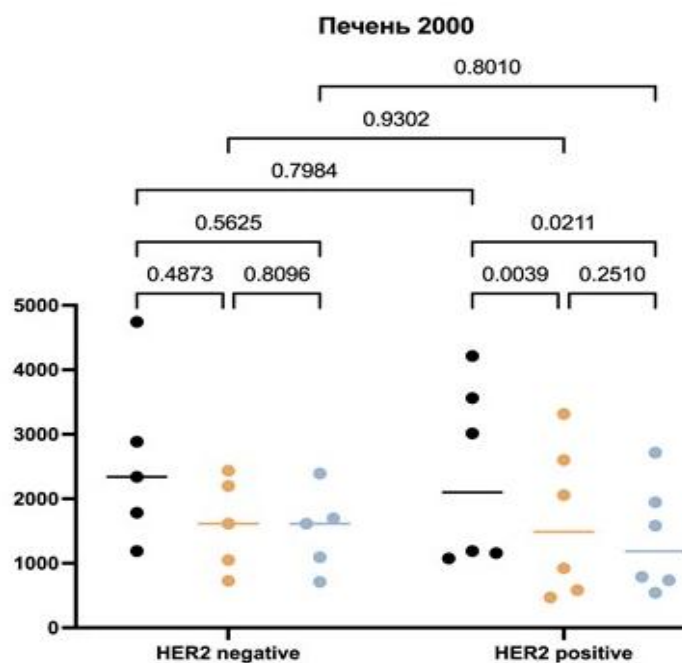


Рисунок 14 – Аккумуляция препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в печени у больных раком молочной железы в дозировке протеина 2000 мкг через 2, 4 и 6 часов после введения

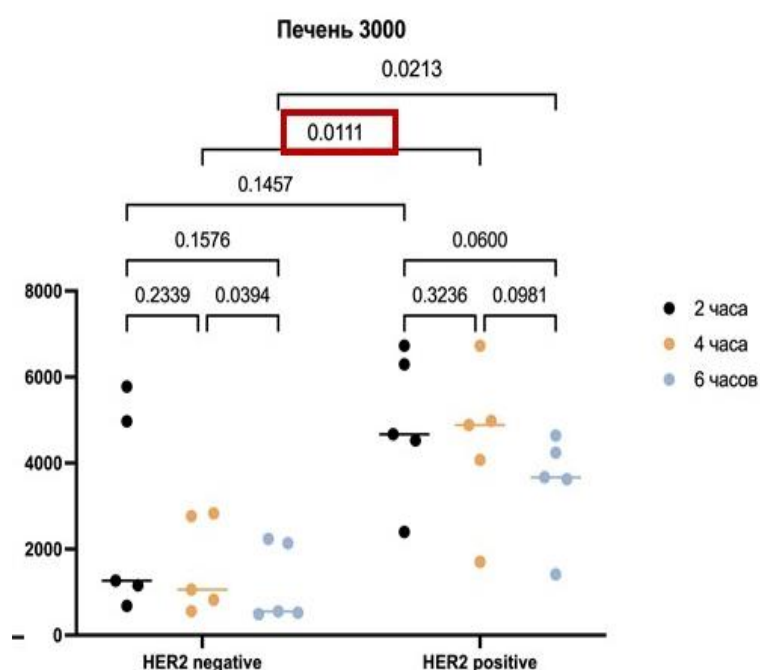


Рисунок 15– Аккумуляция препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в печени у больных раком молочной железы в дозировке протеина 3000 мкг через 2, 4 и 6 часов после введения

Таким образом, применение радиофармацевтического лекарственного препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ позволяет визуализировать первичные

опухоли у больных РМЖ независимо от статуса HER2/neu через 2, 4 и 6 часов после введения. Выполненный анализ аккумуляции [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в проекции первичной опухоли и печени позволил определить оптимальные для разделения опухолей молочной железы в зависимости от статуса HER2/neu дозировку протеина и временной интервал, равные 3000 мкг и 4 часам после введения ($p = 0,011$, Mann-Whitney test).

Дополнительные данные по накоплению препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в печени демонстрируют его более низкую аккумуляцию по сравнению с ранее изученным препаратом [^{99m}Tc]Tc-DARPin9_29, что может свидетельствовать о возможности использования изучаемого соединения в оценке распространенности опухолевого процесса, а именно визуализации метастатических изменений [3, 4].

3.2 Определение оптимального диагностического критерия для дифференцировки статуса HER2/neu в первичной опухоли молочной железы с использованием препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3

Для решения поставленных задач выполнялось изучение аккумуляции радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в дозировке протеина 3000 мкг через 4 часа после введения в первичной опухоли, контрлатеральном участке противоположной молочной железы (фон), ШМС и печени у больных РМЖ. Дополнительно анализировались соотношения опухоль/фон, опухоль/ШМС и опухоль/печень. Ме [Q1 – Q3]) у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu представлена в таблице 12.

Выполненный анализ продемонстрировал, что статистическую значимость для разделения опухолей молочной железы в зависимости от статуса HER2/neu имели параметр накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в опухоли ($p = 0,0011$), а также соотношения опухоль/фон ($p = 0,0003$) и опухоль/ШМС ($p = 0,0218$) (рисунок 20).

Таблица 12 – Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2

Параметры накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3	Me [Q1 – Q3]		p
	HER2-негативные опухоли МЖ	HER2-позитивные опухоли МЖ	
Опухоль	1456,5 [798,25 – 1864,75]	3163,5 [2350,75 – 7421]	0,0011
Фон	319 [170 – 666,75]	312,5 [225 – 427,25]	0,8861
Печень	332 [64,2 – 843,75]	370 [187,25 – 652]	0,7503
ШМС	939 [327,25 – 1925,25]	1345 [152,25 – 3172]	0,8218
О/фон	4,409 [2,49 – 7,54]	11,63 [6,13 – 20,16]	0,0003
О/печень	5,69 [1,73 – 14,59]	13,04 [3,55 – 28,57]	0,0845
О/ШМС	0,98 [0,82 – 3,13]	3,2 [2,21 – 10,73]	0,0218

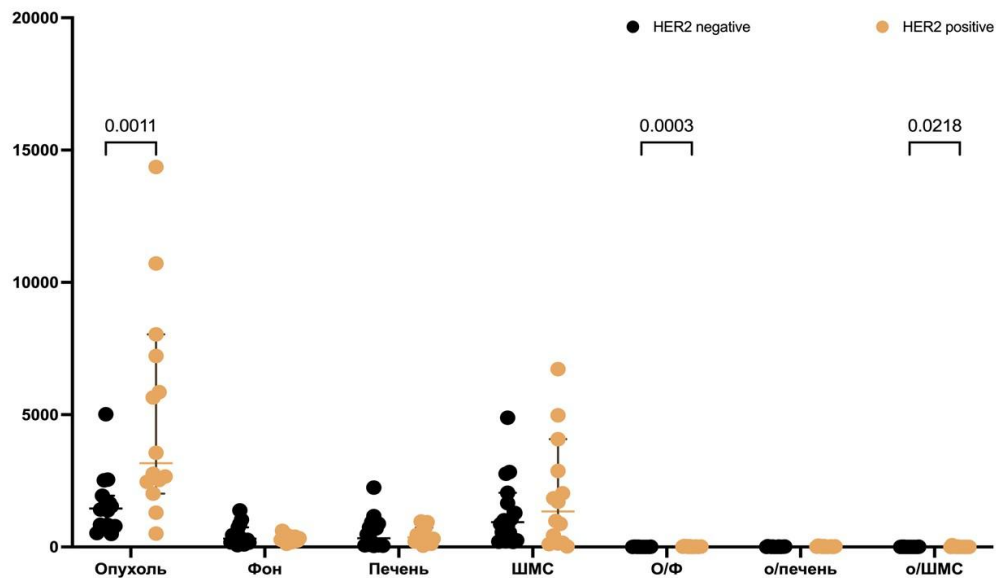


Рисунок 20 – Параметры накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu

Данные выполненного ROC анализа в отношении обладающих статистической значимостью параметров дифференцировки статуса HER2/neu первичной опухоли при использовании препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных раком молочной железы продемонстрировали, что

показатели чувствительности и специфичности составили:

- для накопления в опухоли – 85,71 % и 81,25 % с пороговым значением >1975 импульсов (AUC 0,08; 95% ДИ 0,68-0,99) (рисунок 21);
- для соотношения опухоль/фон – 71,43 % и 87,50 % с пороговым значением >8,31 отн. ед. (AUC 0,06; 95% ДИ 0,73-0,99);
- для соотношения опухоль/ШМС – 75% с пороговым значением 1,93 отн. ед. (AUC 0,09; 95% ДИ 0,56-0,93).

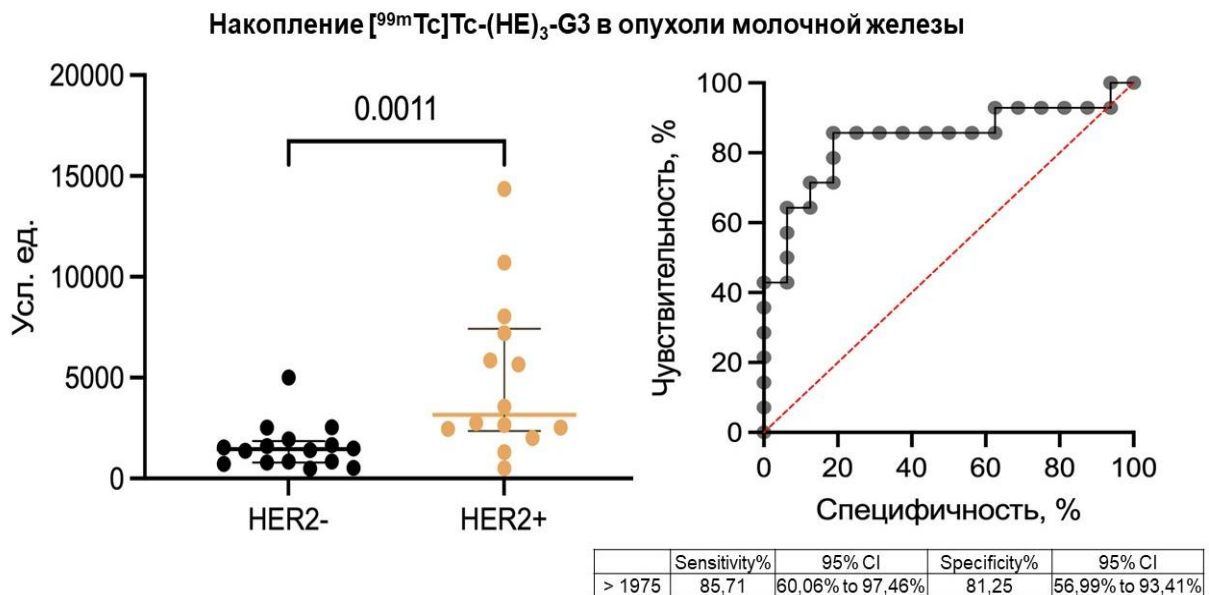


Рисунок 21 – Данные ROC-анализа накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в опухоли для дифференцировки статуса рецептора HER2/neu в у больных раком молочной железы

Таким образом, проведенный статистический анализ продемонстрировал, что наиболее информативными критериями для разделения первичных опухолей молочной железы в зависимости от экспрессии рецептора HER2/neu являются накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в опухоли ($p = 0,0011$), а также соотношения опухоль/фон ($p = 0,0003$) и опухоль/ШМС ($p = 0,0218$). При этом, наибольшей чувствительностью и специфичностью (85,71 % и 81,25 % с пороговым значением >1975 импульсов) обладал показатель накопления в опухоли.

3.2.1 Модель логистической регрессии для прогнозирования экспрессии HER2/neu в первичной опухоли молочной железы при применении [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3

В ходе выполнения работы была разработана математическая модель прогнозирования HER2-статуса первичной опухоли молочной железы на основе параметра накопления радиофармацевтического препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в опухоли. Модель демонстрирует высокую диагностическую эффективность: отношение шансов составило 81,00 (95 % ДИ: 5,020 – 941,2), чувствительность и специфичность достигли 81,25 % и 85,7 % ($p = 0,0001$).

Уравнение логистической регрессии имеет следующий вид:

$$Y = -5,13 + 3,258 \times X_1,$$

где X_1 – накопление препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в опухоли (1 при накоплении < 1975 импульсов; 2 при ≥ 1975 импульсов).

Оценка статуса рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu в первичной опухоли определяется по формуле:

$$P = e^Y / (1 + e^Y),$$

где P – значение вероятности развития признака; Y – значение уравнения регрессии; e – математическая константа, равная 2,72.

При P более или равно 50 % определяют высокую вероятность положительного HER2-статуса, а при P менее 50 % – низкую.

Возможность клинического применения разработанной модели логистической регрессии иллюстрируется следующими клиническими примерами.

Пример 1. Больная Л. (№ 1), 51 год, IIВ стадия (T2N1M0), проходила обследование и лечение на базе НИИ онкологии ТНИМЦ. По данным морфологического и ИГХ исследований были получены данные за инвазивную карциному неспецифического типа, экспрессия рецепторов

эстрогена 6 баллов, рецепторов прогестерона 6 баллов, HER2/neu 3 + (положительная).

До начала системного лечения пациентке было выполнено исследование с радиофармацевтическим лекарственным препаратом [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в дозировке протеина 3000 мкг. Через 4 часа после введения по данным ОФЭКТ накопление препарата в первичной опухоли составило 10715 импульсов.

Для оценки статуса HER2/neu в первичной опухоли больных раком молочной железы использовалась разработанная модель логистической регрессии: $Y = -5,13 + 3,258 \times 2$. Значение вероятности рассчитывалось по формуле $P = 2,72^{1,386} / (1 + 2,72^{1,386}) = 0,80$

Согласно разработанной модели, вероятность HER2-позитивного статуса опухоли молочной железы составила 80 %, что совпадало с данными иммуногистохимического исследования.

Пример 2. Больная О. (№ 18), 49 лет, ПА стадия (T2N0M0). По результатам морфологического и иммуногистохимического исследований были получены данные за инвазивную карциному неспецифического типа, экспрессия рецептора эстрогена 0 баллов, рецептора прогестерона 0 баллов, HER2/neu 1+ (отрицательный).

До начала системного лечения было выполнено исследование с радиофармацевтическим лекарственным препаратом [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в дозировке протеина 3000 мкг. Через 4 часа после введения по данным ОФЭКТ накопление препарата в первичной опухоли составило 1539 импульсов.

Для оценки статуса HER2/neu в первичной опухоли больных раком молочной железы использовалась разработанная модель логистической регрессии: $Y = -5,13 + 3,258 \times 1 = -1,872$. Значение вероятности рассчитывалось по формуле $P = 2,72^{-1,872} / (1 + 2,72^{-1,872}) = 0,13$.

Согласно разработанной модели, вероятность HER2-позитивного статуса опухоли молочной железы составила 13 %, что совпадало с данными иммуногистохимического исследования.

3.3 Корреляция накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с основными клинико-морфологическими параметрами у больных раком молочной железы

Возраст пациенток. Ме [Q1 – Q3]) у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu и в зависимости от возраста пациенток представлена в таблице 13.

Таблица 13 – Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с возрастом у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Параметры накопления [^{99m} Tc]Tc-(HE) ₃ -G3	Ме [Q1 – Q3]		p
	Моложе 45 лет	45 лет и старше	
Опухоль	2463 [842 – 3562]	1935 [1382 – 5014]	0,9326
Фон	245 [176 – 427]	328 [188 – 450]	0,4706
Печень	464 [134 – 940]	310 [81 – 668]	0,3330
ШМС	434 [135 – 1842]	1285 [824 – 2833]	0,0374
О/фон	6,10 [4,28 – 10,05]	6,74 [2,92 – 13,20]	0,0932
О/печень	3,80 [2,55 – 18,71]	10,64 [3,62 – 22,57]	0,3721
О/ШМС	6,37 [1,41 – 18,24]	1,075 [0,83 – 3,53]	0,0234

По результатам проведенного анализа статистическая разница была выявлена при использовании параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в ШМС и соотношения опухоль/ШМС. Так аккумуляция соединения в ШМС была выше в подгруппе больных 45 лет и старше (p = 0,0374), а соотношение опухоль/ШМС выше у больных моложе 45 лет (p = 0,0234) (рисунок 22). Выявленная закономерность сохранялась только в

подгруппе больных HER2-позитивным РМЖ, в которой дополнительно была обнаружена связь возраста пациентов с соотношением накопления препарата в опухоли против печени ($p=0,0379$) (рисунок 23). Ме [Q1 – Q3]) у больных HER2-позитивным раком молочной железы в зависимости от возраста пациенток представлена в таблице 14.

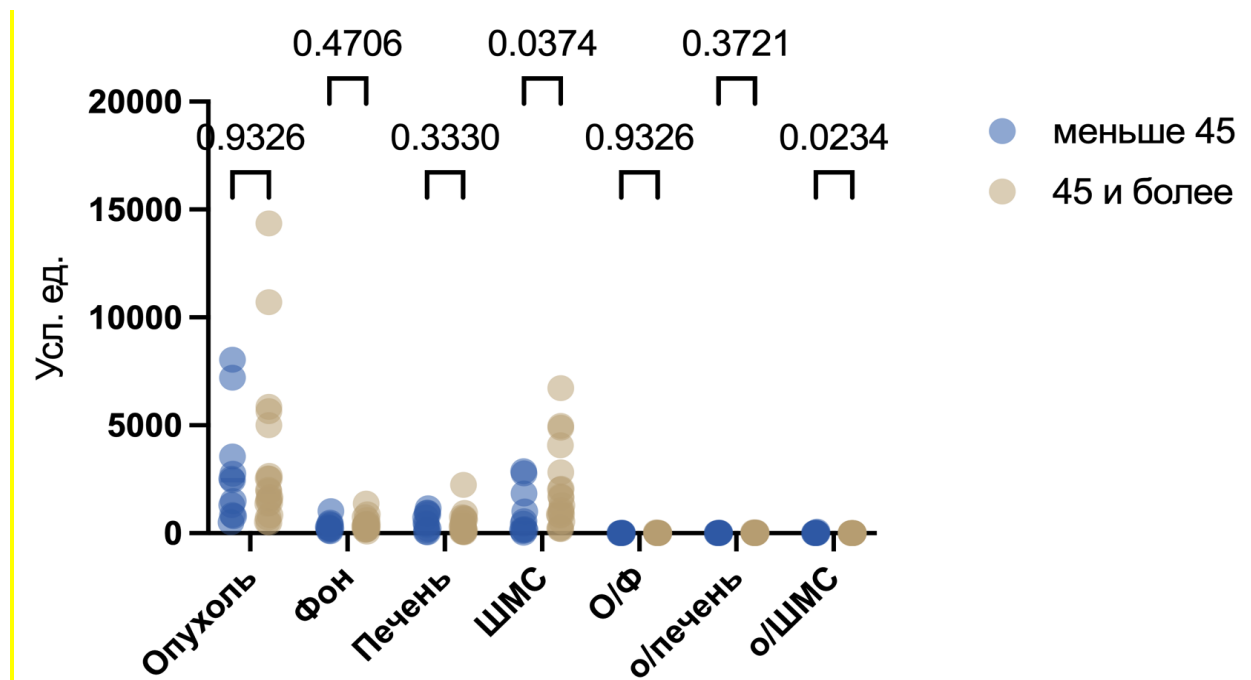


Рисунок 22 – Параметры накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в зависимости от возраста у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Таблица 14 – Сравнение параметров накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с возрастом у больных HER2-позитивным раком молочной железы

Параметры накопления $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$	Ме [Q1 – Q3]		p
	Моложе 45 лет	45 лет и старше	
Опухоль	2765 [1300 – 7216]	5653 [2532 – 10715]	0,3176
Фон	245 [213 – 427]	328 [272 – 428]	0,1649
Печень	464 [205 – 940]	310 [118 – 398]	0,0262
ШМС	158 [106 – 1842]	2029 [982 – 4876]	0,2593
О/фон	8,34 [5,69 – 26,97]	13,47 [9,79 – 17,89]	0,0379
О/печень	3,80 [2,55 – 20,24]	22,58 [9,01 – 38,73]	0,0379
О/ШМС	8,22 [2,78 – 20,36]	2,71 [0,84 – 3,54]	0,3829

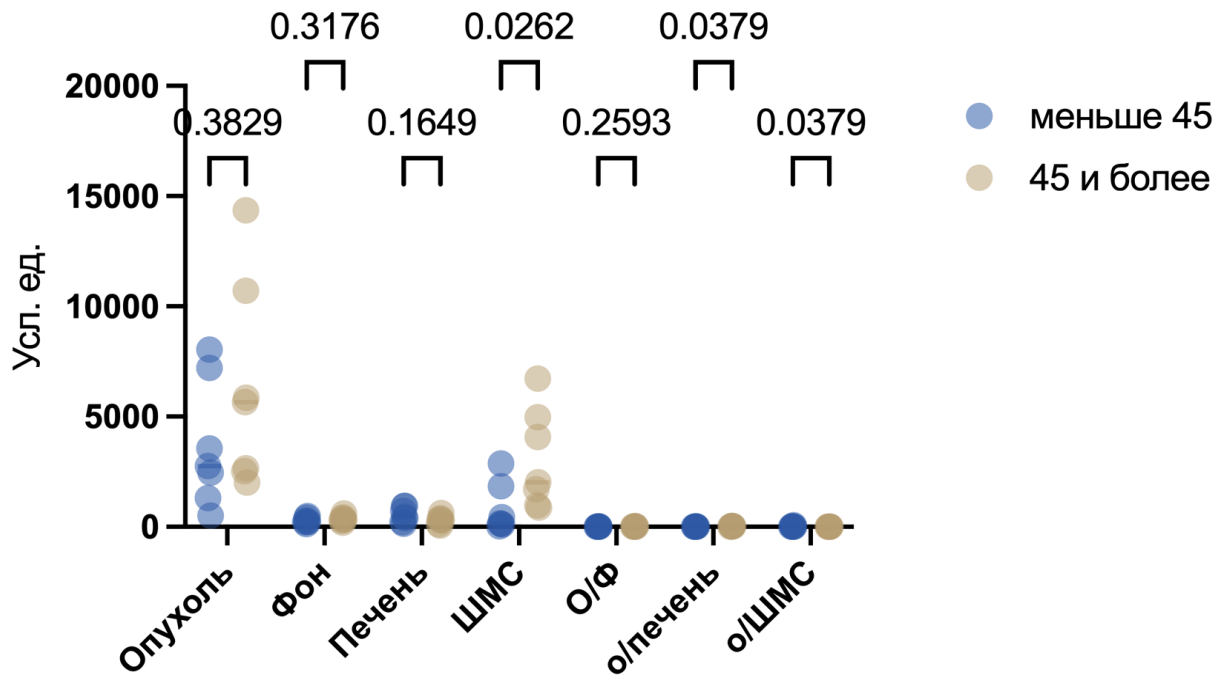


Рисунок 23 – Параметры накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в зависимости от возраста у больных HER2-позитивным раком молочной железы

Менструальная функция. Ме [Q1 – Q3]) у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu в зависимости от состояния менструальной функции пациенток представлена в таблице 15. Результаты проведенного анализа демонстрируют отсутствие статистически значимых различий между группами больных с сохранной менструальной функцией и в состоянии менопаузы по всем исследованным параметрам накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ (рисунок 24).

Таблица 15 – Сравнение параметров накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с состоянием менструальной функции у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu

Параметры накопления $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$	Ме [Q1 – Q3]		p
	Сохранена	Менопауза	
Опухоль	2463 [838,5 – 3163,5]	1935 [1398 – 5753]	0,7416
Фон	269 [182 – 438,5]	328 [191 – 520]	0,6801
Печень	398 [97,5 – 802,5]	310 [88,5 – 704,5]	0,8281

Параметры	Me [Q1 – Q3]		p
ШМС	1009 [175 – 2801]	982 [400,1 – 1868,5]	0,8047
О/фон	6,10 [4,17 – 11,31]	7,81 [3,24 – 15,35]	0,6206
О/печень	6,36 [2,84 – 16,68]	14,39 [1,95 – 28,57]	0,5358
О/ШМС	6,37 [1,41 – 18,24]	2,71 [1,00 – 4,91]	0,7416

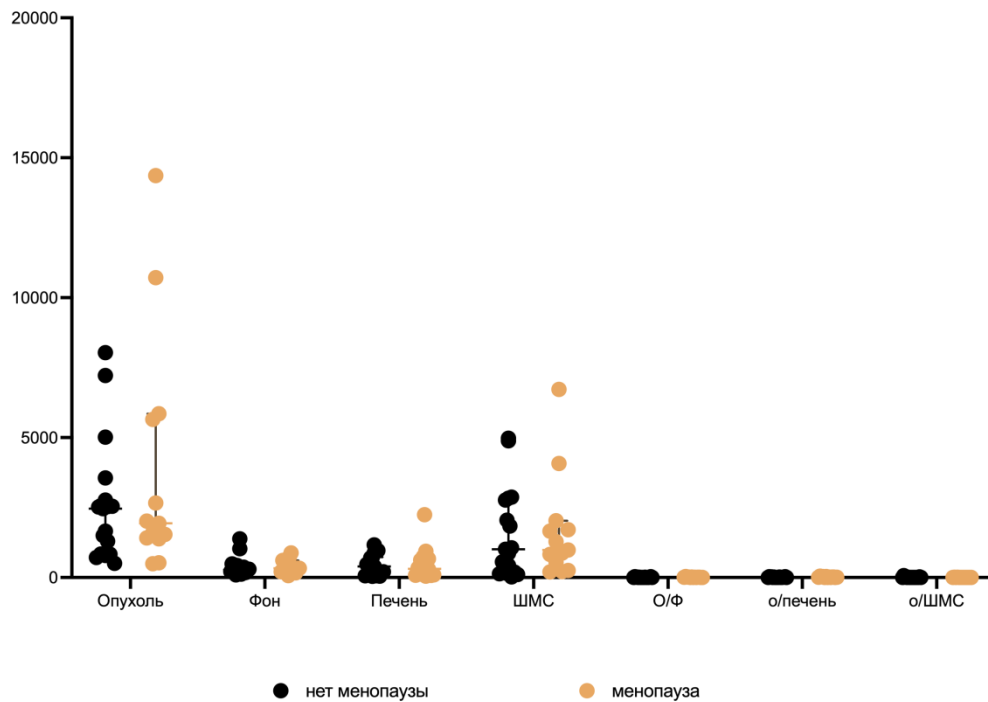


Рисунок 24 – Параметры накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в зависимости от возраста у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Размер опухоли. Me [Q1 – Q3]) у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu в зависимости от размера первичной опухоли представлена в таблице 16. Результаты проведенного анализа демонстрируют статистически значимые различия в накоплении препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в группе больных с размером опухоли менее 30 мм для показателей накопления в ШМС ($p = 0,0014$) и соотношения опухоль/печень ($p = 0,0374$), а также для пациентов с размером опухоли 30 мм и более для параметров накопления в печени ($p = 0,0229$) и соотношения опухоль/ШМС ($p = 0,0053$) (рисунок 25).

Таблица 16 – Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с размером первичной опухоли у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Параметры накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3	Me [Q1 – Q3]		p
	Менее 30 мм	30 мм и более	
Опухоль	2463 [842 – 5014]	1602 [1300 – 2765]	0,7031
Фон	327 [188 – 428]	272 [177 – 486]	0,8990
Печень	205 [74 – 471]	727 [310 – 940]	0,0229
ШМС	1842 [873 – 2871]	254 [192 – 869]	0,0014
О/фон	7,81 [4,28 – 13,21]	5,69 [3,57 – 9,79]	0,5816
О/печень	13,80 [4,33 – 20,24]	2,80 [1,29 – 14,65]	0,0374
О/ШМС	1,03 [0,83 – 2,79]	6,37 [2,71 – 8,09]	0,0053

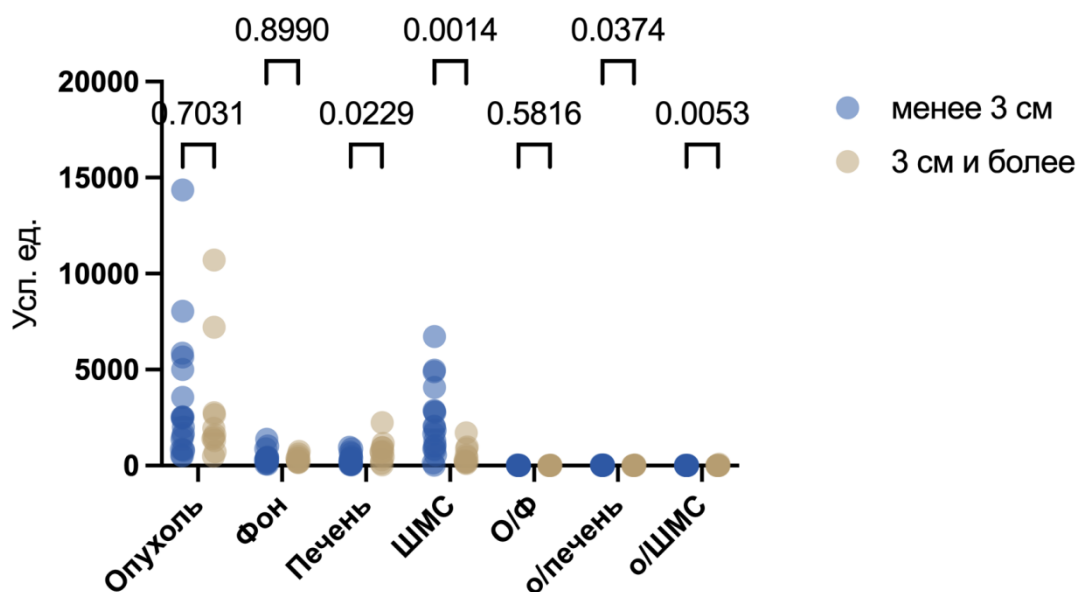


Рисунок 25 – Параметры накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в зависимости от размера первичной опухоли у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Анализ параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных с гиперэкспрессией HER2/neu статистически значимых различий не выявил, в то время как, у больных с отрицательной экспрессией HER2/neu тенденция различий была сохранена для параметров накопления в ШМС ($p = 0,0010$), а также соотношений опухоль/печень и опухоль/ШМС

($p = 0,0110$) (рисунок 26). Ме [Q1 – Q3]) у больных HER2-позитивным раком молочной железы в зависимости от возраста пациенток представлена в таблице 17.

Таблица 17 – Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с размером первичной опухоли у больных HER2-негативным раком молочной железы

Параметры накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3	Ме [Q1 – Q3]		p
	Менее 30 мм	30 мм и более	
Опухоль	1460,5 [822,75 – 2527]	1456,5 [661,25 – 1685,25]	0,5622
Фон	334 [155,75 – 918]	273 [163,75 – 481,75]	0,5622
Печень	88,5 [61 – 529]	839 [513,25 – 839]	0,0529
ШМС	1470,5 [962,75 – 2785]	233 [196,5 – 627,5]	0,0010
О/фон	5,47 [1,85 – 7,92]	3,82 [2,84 – 5,83]	0,9578
О/печень	12,22 [4,15 – 18,79]	1,39 [0,81 – 5,46]	0,0110
О/ШМС	0,90 [0,80 – 1,04]	5,10 [1,66 – 7,88]	0,0110

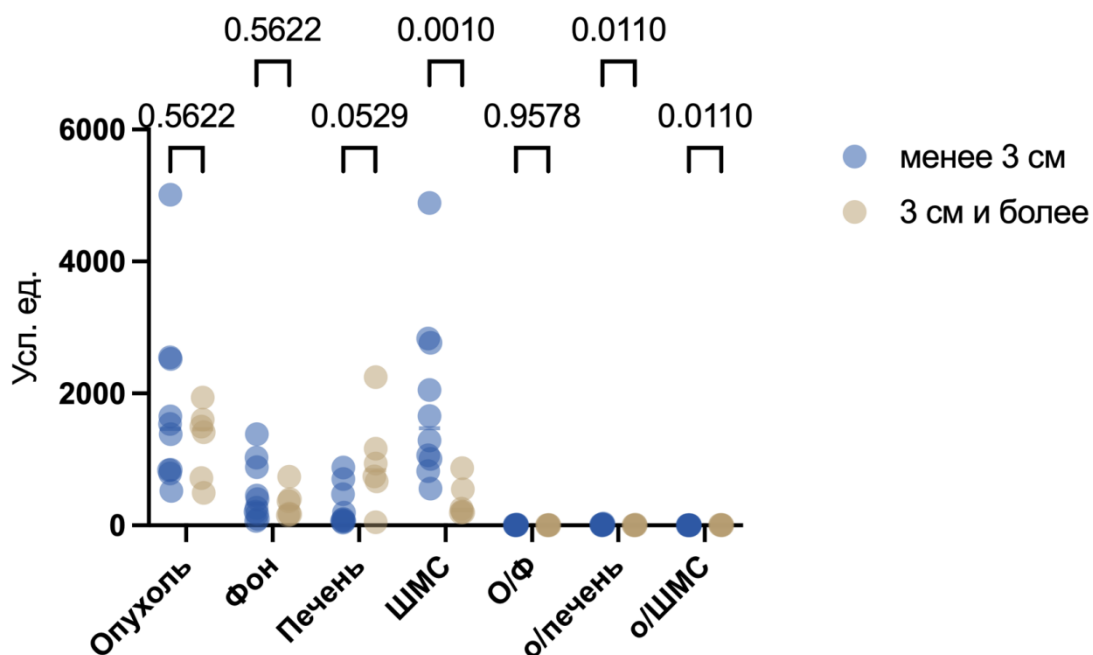


Рисунок 26 – Параметры накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в зависимости от размера первичной опухоли у больных HER2-негативным раком молочной железы

Экспрессия рецепторов эстрогена и маркера клеточной пролиферации Ki67. Ме [Q1 – Q3]) у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu в зависимости от экспрессии рецепторов эстрогена и маркера клеточной пролиферации Ki67 представлены в таблицах 18-20.

Результаты проведенного анализа демонстрируют отсутствие статистически значимых различий между группами с положительной и отрицательной экспрессией рецепторов эстрогена, а также в группах с различной экспрессией маркера клеточной пролиферации Ki67 (рисунок 26, 27).

Таблица 18 – Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с экспрессией рецептора эстрогена у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Параметры накопления [^{99m} Tc]Tc-(HE) ₃ -G3	Ме [Q1 – Q3]		p
	РЭ-отрицательные опухоли	РЭ-положительные опухоли	
Опухоль	1935 [1300 – 5853]	2014 [786 – 3562]	0,5816
Фон	327 [213 – 486]	269 [168 – 427]	0,3495
Печень	295 [96 – 464]	471 [74 – 878]	0,5040
ШМС	1060 [547 – 2029]	869 [198 – 2769]	0,6111
О/фон	6,10 [2,62 – 17,89]	7,80 [4,06 – 12,56]	0,8990
О/печень	14,39 [3,80 – 20,24]	7,07 [2,48 – 18,71]	0,3495
О/ШМС	2,79 [0,93 – 3,54]	1,93 [0,84 – 7,81]	0,8324

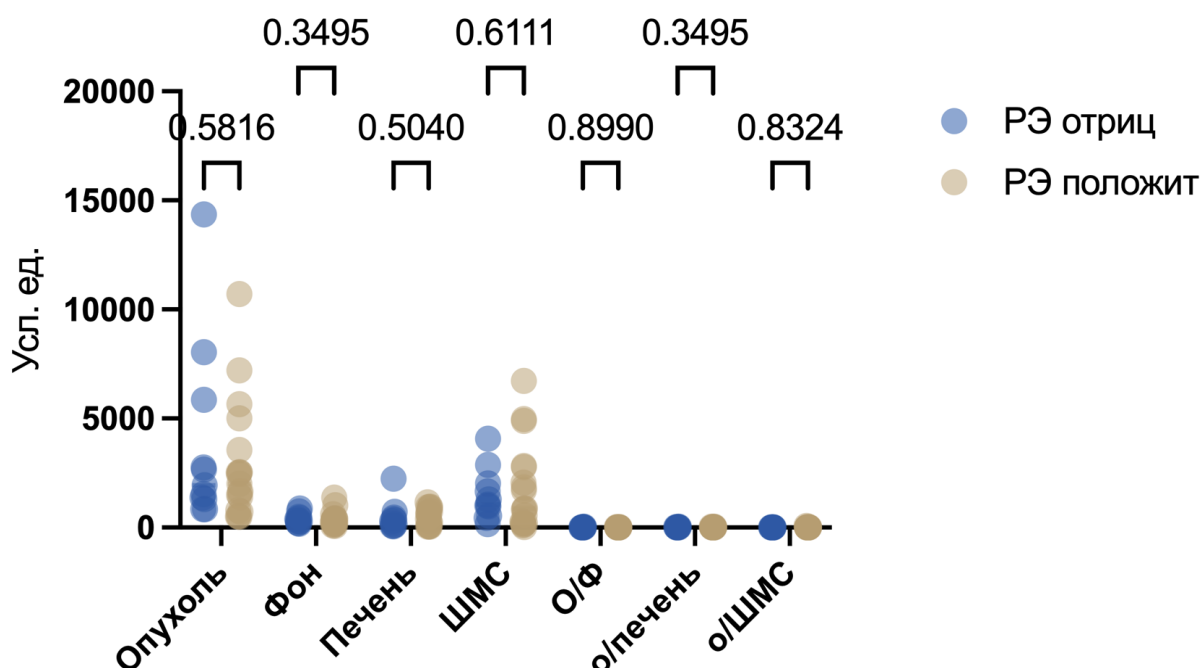


Рисунок 26 – Параметры накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в зависимости от экспрессии рецепторов эстрогена у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Таблица 19 – Сравнение параметров накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с экспрессией маркера клеточной пролиферации Ki67 у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Параметры накопления $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$	Me [Q1 – Q3]		
	Менее 20 %	20-30 %	Более 30 %
Опухоль	2273 [661,25 – 4589,75]	2001 [943 – 6875,25]	1794,5 [1320,5 – 3362,75]
Фон	258 [163,75 – 804,5]	271,5 [128,5 – 378,5]	379 [207 – 444,5]
Печень	354 [51,25 – 712,5]	370 [75,75 – 939,25]	379,5 [122 – 712,25]
ШМС	1290,5 [715,25 – 3369,25]	690,5 [154,25 – 1935,75]	1034,5 [257 – 2589,5]
О/фон	5,45 [2,65 – 14,48]	9,16 [4,63 – 24,69]	6,13 [4,12 – 9,61]
О/печень	10,51 [2,88 – 35,61]	12,37 [3,68 – 18,93]	6,67 [2,56 – 20,53]
О/ШМС	1,42 [0,75 – 3,29]	2,84 [1,05 – 15,35]	2,32 [0,86 – 7,45]

Таблица 20 – Критерии достоверности параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Тс-(НЕ) $_3$ -G3 с экспрессией маркера клеточной пролиферации Ki67 у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Параметры накопления [^{99m}Tc]Тс-(НЕ) $_3$ -G3	Менее 20 % и более 30 %	Менее 20% и 20-30 %	20-30 % и более 30 %
Опухоль	0,8136	0,6925	0,4512
Фон	0,8997	0,8435	0,9149
Печень	0,8284	0,9014	0,9323
ШМС	0,8238	0,2662	0,2539
О/фон	0,9993	0,9942	0,9936
О/печень	0,9950	0,9952	0,9995
О/ШМС	0,9975	0,9892	0,9893

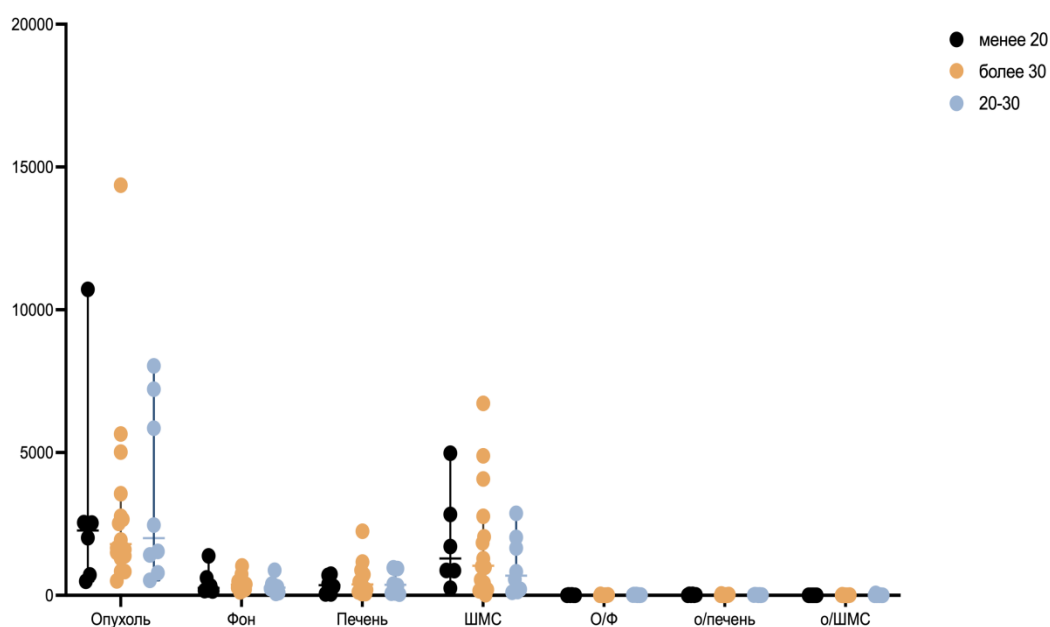


Рисунок 27 – Параметры накопления препарата [^{99m}Tc]Тс-(НЕ) $_3$ -G3 в зависимости от экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67 у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Стадия заболевания. Ме [Q1 – Q3]) у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/neu в зависимости от стадии заболевания представлена в таблице 21. По результатам исследования статистические различия в группах были продемонстрированы при использовании соотношения опухоль/ШМС с большими значениями у

больных без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов ($p = 0,0276$) (рисунок 28).

Таблица 21 – Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с состоянием регионарных лимфатических узлов у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Параметры накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3	Me [Q1 – Q3]		p
	T2N0M0	T2N1-3M0-1	
Опухоль	1550,5 [1183,75 – 4007]	2491,5 [977 – 4651]	0,6811
Фон	313 [204 – 390,75]	298 [179 – 580,5]	0,7457
Печень	346 [174,25 – 735,25]	370,5 [75,75 – 737,5]	0,9067
ШМС	542,5 [183,5 – 1512,75]	1470,5 [549,5 – 2589,5]	0,1552
О/фон	6,12 [3,93 – 14,09]	7,27 [13,05 – 13,05]	0,9483
О/печень	3,56 [2,18 – 26,61]	9,83 [3,67 – 18,30]	0,7132
О/ШМС	5,10 [2,61 – 8,13]	1,05 [0,84 – 3,37]	0,0276

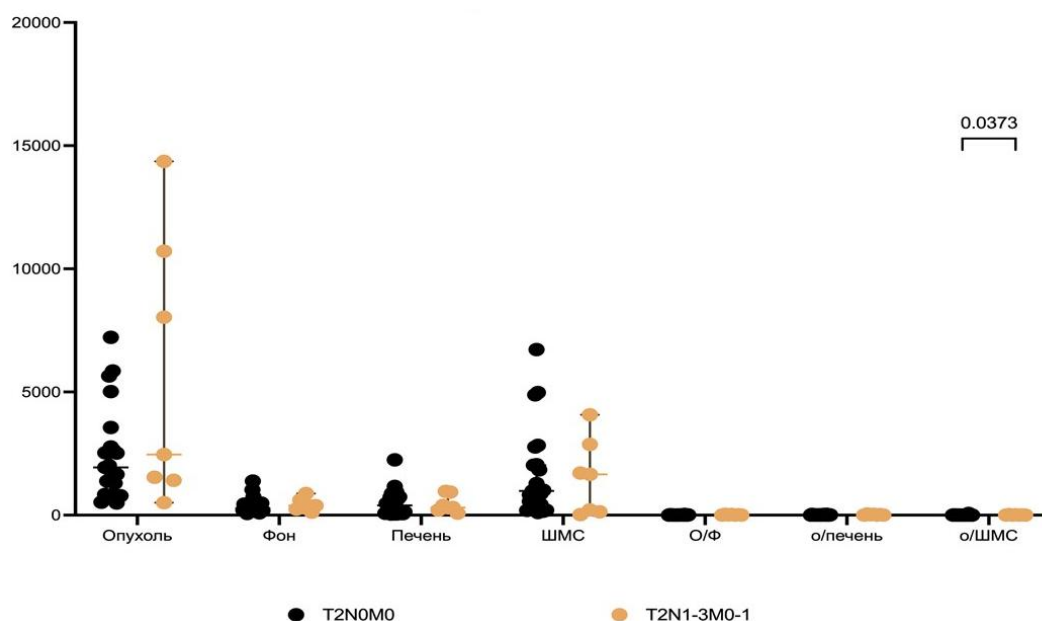


Рисунок 28 – Параметры накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в зависимости от стадии заболевания у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Молекулярно-биологический подтип опухоли. Ме [Q1 – Q3]) у больных раком молочной железы с различным статусом HER2/неу в зависимости молекулярно-биологического подтипа опухоли представлены в таблицах 22-24. Оценка связи всех изучаемых параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с молекулярно-биологическим подтипом показала статистическую значимость только показателя аккумуляции в опухоли. При этом, накопление препарата было достоверно выше в Люминальном В HER2-позитивном и гормон-негативном HER2-позитивном подтипах ($p < 0,05$) по сравнению с Люминальным А, Люминальным В HER2-негативном и трижды негативном подтипах (рисунок 29).

Таблица 22– Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с молекулярным подтипами РМЖ с положительной экспрессией рецептора эстрогена

Параметры накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) ₃ -G3	Ме [Q1 – Q3]		
	Люм А тип	Люм В HER2-отрицательный	Люм В HER2-положительный
Опухоль	718 [491 – 2548]	1550,5 [943 – 2303,5]	3047 [2126,3 – 6825,3]
Фон	168 [151 – 1382]	319 [115,5 – 398,25]	286,5 [198,25 – 427,75]
Печень	703 [49 – 741]	569,5 [64,25 – 922,25]	354 [151,75 – 861,75]
ШМС	869 [254 – 2833]	690,5 [201, 5 – 2589, 5]	1290,5 [113,25 – 4194]
О/фон	2,92 [1,84 – 4,75]	6,98 [3,69 – 8,86]	11,63 [6,69 – 16,49]
О/печень	3,62 [0,66 – 14,65]	4,97 [1,73 – 16,69]	8,35 [3,50 – 32,57]
О/ШМС	0,89 [0,83 – 1,93]	1,22 [0,83 – 7,52]	4,29 [1,11 – 19,83]

Таблица 23 – Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с молекулярным подтипами РМЖ с отрицательной экспрессией рецептора эстрогена

Параметры накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3	Me [Q1 – Q3]	
	ТНР	HER2-позитивный подтип
Опухоль	1382 [838,5 – 1737]	4309 [2323 – 9618,25]
Фон	450 [190,5 – 810]	312,5 [257,25 – 413,25]
Печень	96 [71 – 1220,5]	370 [250,75 – 529,75]
ШМС	1060 [778 – 1470,5]	1505,5 [365 – 3172]
О/фон	2,62 [1,80 – 5,76]	13,85 [5,99 – 29,46]
О/печень	13,80 [2,59 – 16,69]	18,65 [3,55 – 29,11]
О/ШМС	0,92 [0,81 – 2,31]	3,20 [2,77 – 6,83]

Таблица 24 – Критерии достоверности параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с молекулярным подтипом опухоли у больных раком молочной железы

Сравнение подтипов	Оп.	Фон	Печ.	ШМС	О/ф	О/п	О/ш
Люм В HER2- и ТНР	0,6254	0,8516	0,9989	0,6405	0,9966	0,9984	0,9979
Люм В HER2- и Люм А	0,5111	0,8073	0,9648	0,8727	0,9968	0,9976	0,9980
Люм В HER2- и Люм В HER2+	0,0884	0,9658	0,8994	0,3711	0,9923	0,9914	0,9861
Люм В HER2- и HER2+	0,0311	0,9763	0,8367	0,6754	0,9882	0,9885	0,9989
ТНР и Люм А	0,8195	0,9762	0,9683	0,8289	0,9997	0,9965	0,9998
ТНР и Люм В HER2+	0,0474	0,8222	0,9129	0,2114	0,9899	0,9941	0,9857
ТНР и HER2+	0,0172	0,8411	0,8552	0,4764	0,9863	0,9912	0,9970
Люм А и Люм В HER2+	0,0554	0,7829	0,9607	0,4118	0,9911	0,9913	0,9878
Люм А и HER2+	0,0229	0,7992	0,9083	0,6361	0,9879	0,9889	0,9972
Люм В HER2+ и HER2+	0,5630	0,9901	0,9290	0,6818	0,9953	0,9964	0,9883

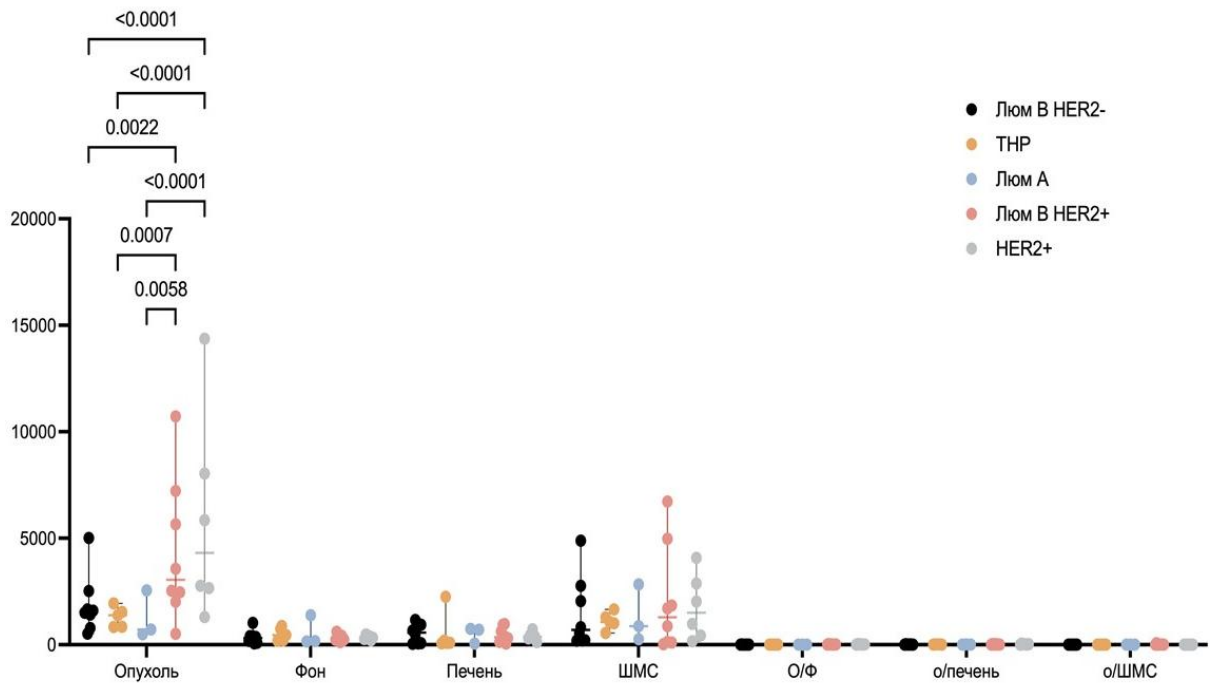


Рисунок 29 – Соотношение накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ у больных раком молочной железы с различными молекулярно-биологическими фенотипами

Таким образом, в ходе настоящего исследования впервые была продемонстрирована связь накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с некоторыми клинико-морфологическими параметрами у больных РМЖ. Так, связь накопления $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в опухоли с возрастом была выявлена только у больных HER2-положительным РМЖ, а связь накопления препарата с размером опухоли обнаружена только в группе с HER2-негативным статусом, что косвенно указывает на высокую специфичность исследуемого препарата. Обнаруженная связь соотношения опухоль/ШМС со стадией отражает общую тенденцию более агрессивного поведения HER2-положительного РМЖ.

3.4 Сопоставление накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с эффективностью предоперационного лечения у больных раком молочной железы

Me [Q1 – Q3]) у больных раком молочной железы с различным

статусом HER2/neu в зависимости от патоморфологического ответа опухоли на предоперационное лечение представлены в таблице 25. Результаты проведенного анализа продемонстрировали отсутствие статистически значимых различий между группами pCR и non-pCR по всем исследованным параметрам (рисунок 30).

Таблица 25 – Сравнение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в зависимости от ответа опухоли на предоперационное системное лечение у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2/neu

Параметры накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3	Me [Q1 – Q3]		p
	pCR	Non-pCR	
Опухоль	3562 [2532 – 5853]	2664 [2014 – 10715]	>0,9999
Фон	327 [213 – 428]	298 [245 – 389]	>0,9999
Печень	464 [343 – 727]	295 [118 – 397]	0,1282
ШМС	1842 [158 – 4978]	982 [135 – 2871]	0,6200
О/фон	13,21 [6,10 – 17,89]	10,05 [6,14 – 26,97]	0,9015
О/печень	7,67 [3,80 – 17,06]	22,58 [2,55 – 38,74]	0,3176
О/ШМС	2,88 [0,84 – 8,22]	3,53 [2,71 – 18,24]	0,6200

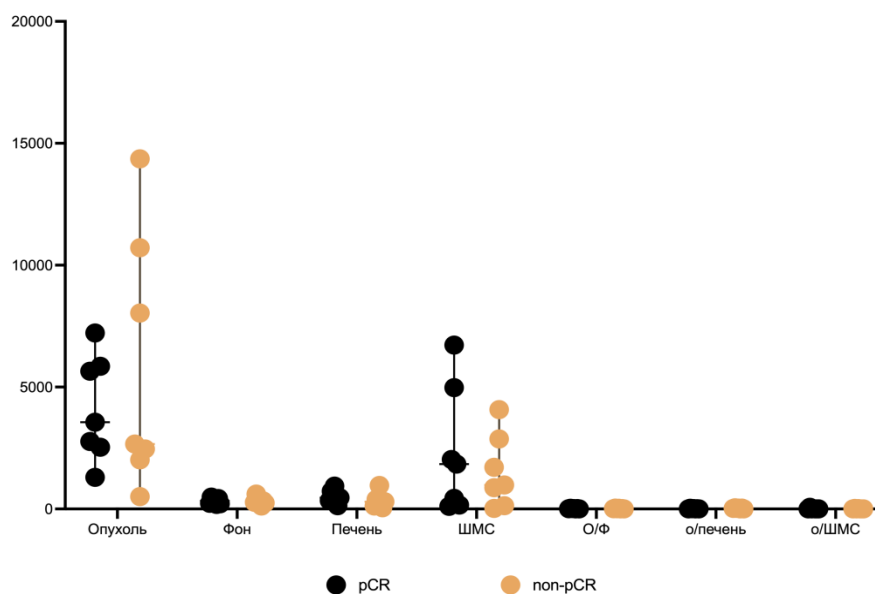


Рисунок 31 – Соотношение параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с эффективностью предоперационного лечения у больных раком молочной железы

Таким образом, в ходе проведенного анализа не была выявлена корреляция накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с патоморфологическим ответом опухоли на предоперационное лечение у больных раком молочной железы. В тоже время, полученные результаты требуют осторожной интерпретации в связи с ограниченным объемом выборки и, как следствие, недостаточной статистической мощностью анализа. Отсутствие статистически значимых различий не исключает потенциальной клинической значимости выявленных тенденций, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований на более представительных когортах пациентов.

3.5 Соотношение накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с выживаемостью у больных раком молочной железы

Интересным является обнаруженный факт различия в соотношении накопления опухоль/ШМС при анализе групп больных раком молочной железы с наличием или отсутствием отдаленных метастазов, возникших в период наблюдения. Большее соотношение опухоль/ШМС было обнаружено у пациентов с развившимися гематогенными метастазами (5,09 (2,61 – 8,12)) по сравнению с пациентами без метастазов (1,05 (0,83 – 3,37), $p = 0,028$) (рисунок 32А).

Проведение ROC-анализа показало, что соотношение опухоль/ШМС обладает высокой прогностической ценностью ($\text{AUC} = 0,75$ (95 % ДИ 0,55 – 0,95)) (рисунок 32Б). Было показано, что использование порогового значения соотношения опухоль/ШМС равного 2,12 отн. ед. позволяет с чувствительностью 70% и специфичностью 90 % прогнозировать развитие гематогенных метастазов в отдаленном периоде у больных РМЖ ($p = 0,028$).

Далее, была проанализирована безметастатическая и бессобытийная выживаемость в зависимости от параметров накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в опухоли и от клинико-морфологических параметров. Оценка показала, что ни HER2 статус по ИГХ, ни пороговое значение накопления [^{99m}Tc]Tc-

(HE)₃-G3 в опухоли не связаны с безметастатической (рисунок 33А и рисунок 33Б) и бессобытийной выживаемостью.

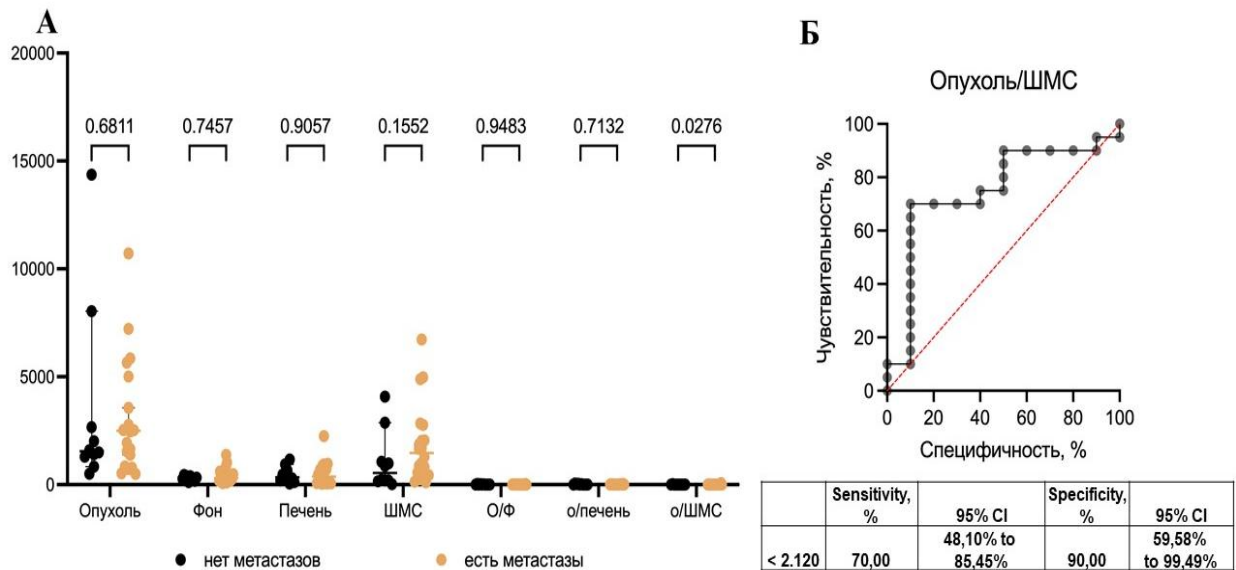


Рисунок 32 – Связь накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с развитием гематогенных метастазов в периоде наблюдения у больных раком молочной железы с различной экспрессией HER2 (А) и ROC кривая прогностической ценности соотношения опухоль/ШМС (Б)

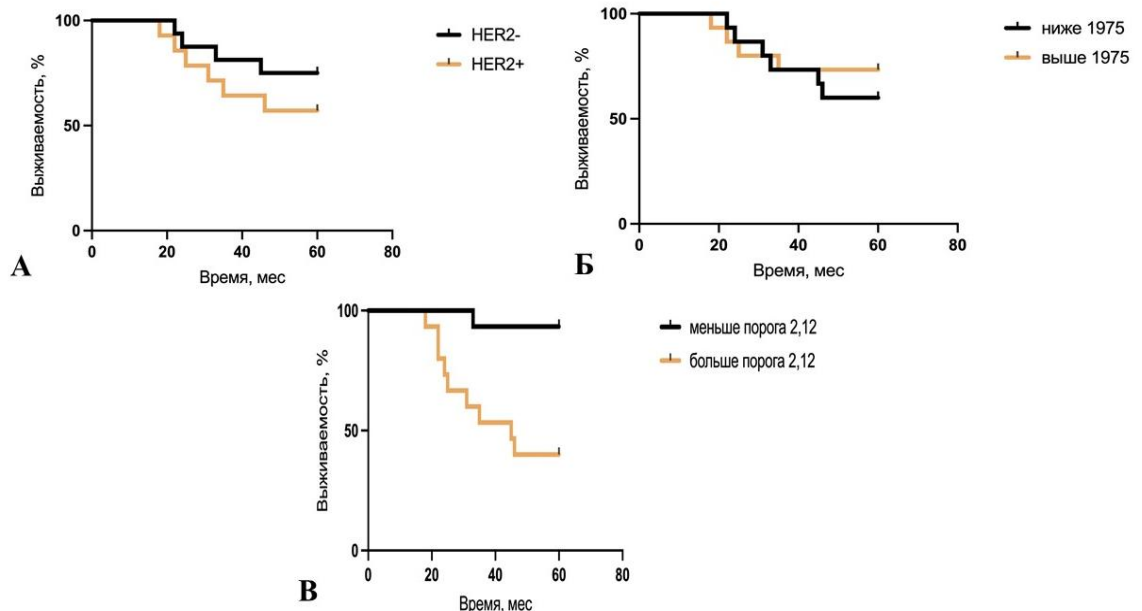


Рисунок 33 – Кривые безметастатической выживаемости у больных РМЖ, стратифицированных по HER2 статусу (А), пороговому значению накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли (Б) и пороговому значению соотношения опухоль/ШМС (В)

В тоже время, анализ безметастатической выживаемости больных РМЖ в зависимости от обнаруженного прогностического порогового значения соотношения опухоль/ШМС равного 2,12 отн. ед. позволил выявить достоверную связь. Больные, имеющие соотношение накопления [^{99m}Tc]Тс-(НЕ) $_3$ -G3 в опухоли против ШМС $\geq 2,12$ отн. ед., демонстрировали безметастатическую выживаемость на конец наблюдения, равную 40,0 %. В тоже время больные со значениями ниже порогового значения – 93,3% ($p = 0,0019$) (рисунок 33В). Для более полного анализа показателей безметастатической выживаемости дополнительно был проведен Кокс-регрессионный анализ (таблица 26).

Таблица 26 – Однофакторный и многофакторный Кокс-регрессионный анализ клинико-морфологических параметров и параметров накопления [^{99m}Tc]Тс-(НЕ) $_3$ -G3 у больных раком молочной железы

Параметр		Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
		HR	95%ДИ	p	HR	95%ДИ	p
порог опухоль/ШМС	< 2,12						
	$\geq 2,12$	12,82	2,39-236,9	0,015	11,49	1,03-355,9	0,035
ИГХ HER2	Отр.						
	Пол.	1,91	0,54-7,49	0,315			
НАХТ	нет						
	pCR	0,92	0,02-23,3	0,951	0,21	0,006-7,94	0,847
	non-pCR	8,95	1,62-166,8	0,039	1,32	0,11-49,02	0,371
Лимфогенные метастазы	нет						
	есть	2,73	0,69-9,61	0,121			

В ходе однофакторного анализа выживаемости было установлено, что превышение порогового значения соотношения накопления препарата [^{99m}Tc]Тс-(НЕ) $_3$ -G3 в опухоли по отношению к ШМС ($\geq 2,12$ отн. ед.)

ассоциировано со значительным увеличением риска неблагоприятного исхода. Так, при значении показателя $\geq 2,12$ отн. ед. риск возрастал в 12,8 раза по сравнению с группой с низким накоплением препарата (HR = 12,82 (95 % ДИ 2,39 – 236,9), $p = 0,015$). В многофакторном анализе данный параметр сохранил статистическую значимость (HR = 11,49 (95 % ДИ 1,03 – 355,9), $p = 0,035$), что указывает на его независимую прогностическую ценность. Экспрессия HER2 по ИГХ не продемонстрировала статистически значимой связи с прогнозом: при HER2-положительном статусе HR составил 1,91 (95 % ДИ 0,54 – 7,49, $p = 0,315$).

Оценка влияния неoadъювантной химиотерапии показала, что достижение pCR не ассоциировалось с улучшением прогноза ни в однофакторном (HR = 0,92 (95 % ДИ 0,02 – 23,3), $p = 0,951$), ни в многофакторном анализе (HR = 0,21 (95 % ДИ 0,006 – 7,94), $p = 0,847$). В то же время отсутствие pCR (non-pCR) в однофакторной модели сопровождалось статистически значимым увеличением риска неблагоприятного исхода (HR = 8,95 (95% ДИ 1,62 – 166,8), $p = 0,039$), однако в многофакторной модели данный параметр утрачивал достоверность (HR = 1,32 (95 % ДИ 0,11 – 49,02), $p = 0,371$).

Таким образом, В настоящем исследовании было продемонстрировано, что соотношение накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли против ШМС является клинически значимым прогностическим показателем, обладающим высокой чувствительностью (70 %) и специфичностью (90 %). Выбранное пороговое значение $\geq 2,12$ отн. ед. позволило выделить группу пациентов с существенно более высоким риском неблагоприятного исхода. Сохранение статистической значимости данного параметра в многофакторном анализе подтверждает его независимую прогностическую роль и указывает на то, что функциональные характеристики накопления препарата могут превосходить традиционные морфологические маркеры. Отсутствие достоверной связи между ИГХ-статусом HER2 и прогнозом подчеркивает потенциальные

ограничения иммуногистохимической оценки как единственного критерия стратификации риска. В этом контексте визуализация и количественная оценка накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ отражают не только уровень экспрессии рецептора, но и его биологическую доступность *in vivo*, что может объяснять выявленное расхождение между ИГХ-данными и результатами радионуклидного анализа.

Несмотря на то, что отсутствие полного патоморфологического ответа на НАХТ ассоциировалось с ухудшением прогноза в однофакторном анализе, данный показатель не продемонстрировал независимой прогностической значимости. Это может свидетельствовать о том, что эффективность НАХТ опосредована другими биологическими факторами, в том числе особенностями накопления таргетного радиофармацевтического препарата. Метастатическое поражение лимфатических узлов, традиционно рассматриваемое как неблагоприятный фактор, в представленном исследовании не достигли статистической значимости, что, вероятно, связано с ограниченным размером выборки.

3.5.1 Модель логистической регрессии для прогнозирования развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы при использовании радиофармацевтического препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$

С учетом полученных результатов была построена модель логистической регрессии по прогнозированию развития гематогенного метастазирования у больных раком молочной железы на основе соотношения накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в опухоли против ШМС. Модель демонстрирует высокую диагностическую эффективность: отношение шансов составило 0,80 (95 % ДИ 0,63-0,98), чувствительность и специфичность достигли 70 и 90 % ($X^2 = 10,65$, $p = 0,0011$). Уравнение логистической регрессии имеет следующий вид: $Y = -5,684 + 3,045 \times X_1$, где X_1 – накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в опухоли по отношению

к ШМС (соотношение опухоль/ШМС). Если соотношение опухоль/ШМС ниже порогового значения 2,12 отн. ед., $X_1 = 1$; если соотношение опухоль/ШМС было $\geq$ порогового значения 2,12 отн. ед., $X_1 = 2$.

Значение вероятности развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы определяется по формуле $P = e^Y / (1 + e^Y)$, где P – значение вероятности развития признака; Y – значение уравнения регрессии; e – математическая константа, равная 2,72. При P более или равно 60 % определяют высокую вероятность развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы при использовании препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$, а при P менее 60 % – низкую.

Возможность клинического применения разработанной модели логистической регрессии иллюстрируется следующими клиническими примерами.

Пример 1. Больная О. (№4), 37 лет, IV стадия (T2N1M0), проходила обследование и лечение на базе НИИ онкологии ТНИМЦ. По данным морфологического и ИГХ исследований были получены данные за инвазивную карциному неспецифического типа, экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона положительная, HER2/neu 1+ (отрицательный).

До начала системного лечения пациентке было выполнено исследование с препаратом $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в дозировке протеина 3000 мкг. Через 4 часа после введения по данным ОФЭКТ накопление препарата в первичной опухоли составило 509 импульсов, в ШМС – 25, соотношение опухоль/ШМС – 20,36.

Для оценки вероятности развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы после введения $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ использовалась разработанная модель логистической регрессии: $Y = -5,684 + 3,045 \times 20,36 = 56,31$

Значение вероятности рассчитывалось по формуле $P = 2,72^{56,31} / (1 + 2,72^{56,31}) = 2,995/3,995 = 0,749$

Согласно разработанной модели, вероятность развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы при использовании препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ составила 75 %, что соответствовало данным анамнеза и результатам обследования на этапах динамического наблюдения (метастазы в кости через 36 месяцев после постановки диагноза).

Пример 2. Больная П. (№ 14), 49 лет, ПА стадия (T2N0M0). По результатам морфологического и иммуногистохимического исследований были получены данные за инвазивную карциному неспецифического типа, экспрессия рецептора эстрогена 0 баллов, рецептора прогестерона 0 баллов, HER2/neu 1+ (отрицательный).

До начала системного лечения на базе отделения радионуклидной терапии и диагностики пациентке было выполнено исследование с радиофармацевтическим лекарственным препаратом $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в дозировке протеина 3000 мкг. Через 4 часа после введения по данным ОФЭКТ накопление препарата в первичной опухоли составило 5014 импульсов, в ШМС – 4886, соотношение опухоль/ШМС – 1,03.

Для оценки вероятности развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы после введения $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ использовалась разработанная модель логистической регрессии: $Y = -5,684 + 3,045 \times 1,03 = -2,55$.

Значение вероятности рассчитывалось по формуле $P = 2,72^{-2,55} / (1 + 2,72^{-2,55}) = 163,73 / 164,73 = 0,077$.

Согласно разработанной модели, вероятность развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы при использовании препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ составила 7,7 %, что соответствовало данным анамнеза и результатам обследования на этапах динамического наблюдения (отсутствие развития гематогенных метастазов за период наблюдения).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гиперэкспрессия эпидермального фактора роста 2 типа имеет существенное значение для пациентов со злокачественными опухолями молочной железы, ассоциируясь с низкими показателями безрецидивной и общей выживаемости [15, 55, 105]. При этом, применение анти-HER2 таргетной терапии у данной категории пациентов существенно улучшает выживаемость, а достижение полных морфологических регрессий при ее использовании в неоадьювантном режиме вовсе приравнивает выживаемость к показателям, наблюдаемым при более благоприятных Люминальных раках [12, 19, 65, 90]. Несмотря на распространенность иммуногистохимического метода оценки статуса HER2/neu, а также определения амплификации гена ERBB2 с помощью FISH анализа [14, 99, 158], диагностика данного молекулярного типа у больных РМЖ на сегодняшний день остается не оптимальной [29, 76, 102].

С клинической точки зрения, существенным недостатком «традиционных» методов определения статуса HER2/neu на диагностическом этапе является невозможность одномоментной анатомической оценки распространенности опухолевого процесса *in vivo*, а также определения молекулярных характеристик выявленных опухолевых очагов до назначения специального лечения [29, 46, 136]. Данный факт имеет особое значение в аспекте возможной неоднородности экспрессии HER2/neu между первичной опухолью и метастатическими узлами (регионарные и отдаленные метастазы), что по литературным данным может встречаться в 6 – 48 % случаев [17, 87, 122]. Особую значимость данный факт приобретает при местно-распространенном и метастатическом раках молочной железы, требующих тщательного подбора системного лечения с учетом характеристик всех опухолевых узлов. При этом, выполнение биопсии или хирургического забора материала из существующих и/или вновь выявленных метастатических очагов в

большинстве случаев не проводится, что обусловлено техническими трудностями, возможным развитием осложнений, а также дополнительными финансовыми затратами [149]. В связи с этим актуальным является разработка новых дополнительных диагностических методик, позволяющих не только одномоментно определять анатомическое расположение опухолевых очагов в организме пациента, но и оценивать их молекулярные характеристики как на этапе первичной диагностики, так и при прогрессировании заболевания, а также на этапах лечения.

В последние годы широко изучается таргетная радионуклидная диагностика с использованием синтетических каркасных протеинов в качестве «нацеливающих» модулей, тропных к определенной молекулярной мишени на поверхности опухолевых клеток [7, 75]. Данная группа обладает оптимальными характеристиками для переноса радиоактивного изотопа и выполнения диагностических исследований, заключающихся в высокой специфичности к искомому рецептору, отсутствием иммуногенности, высокой термостабильностью, возможностью быстрой химической модификации при проведении процессов мечения, быстрой элиминацией из организма пациента, что существенно сокращает временной интервал между введением препарата и началом исследования [6, 101].

В рамках анализа отечественных таргетных радиофармацевтических препаратов для оценки HER2/neu проводится изучение неиммуноглобулиновых адресных молекул *DARPin(HE)₃-G3 (Designed Ankyrin Repeat Proteins)* [80, 131], которые на этапе доклинических исследований продемонстрировали специфичность к HER2/neu и сопоставимое поглощение препаратов опухолью в *in vivo* исследованиях [5, 114, 155]. Результаты I фазы клинических испытаний продемонстрировали у больных раком молочной железы с использованием препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 показали его безопасность, удовлетворительные фармакокинетические свойства, а также более высокое накопление в опухолях молочной железы с высокой экспрессией рецептора HER2/neu

($p < 0,05$, Mann-Whitney U test). Вопросы, касающиеся выбора дозировки протеина для дальнейшего клинического исследования, были затронуты в ходе выполненного анализа лишь частично (Bragina O., 2022).

Изменение парадигм в отношении эффективности таргетных препаратов (использование трастузумаба дерукстекана) в опухолях молочной железы с низкими значениями рецептора HER2/neu [41], а также в отношении бинарного подхода оценки его экспрессии, в частности, способствовало увеличению интереса к возможной эффективности таргетной радионуклидной терапии в аспекте тераностического подхода [18, 33, 36]. При этом, при смене диагностического этапа на терапевтический важным будет определение категории пациентов с различной экспрессией HER2/neu, у которых можно ожидать наибольший эффект от проводимого лечения. В связи с этим, актуальным также является изучение корреляции накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с основными клинικο-морфологическими параметрами, эффективностью предоперационного лечения и показателями выживаемости, что будет способствовать усилению понимания биологических процессов, а также выделению групп пациентов с потенциальной выгодой от таргетной радионуклидной терапии.

Целью настоящей диссертационной работы являлась оценка таргетной детекции рецептора HER2/neu в первичной опухоли больных раком молочной железы с использованием радиофармацевтического лекарственного препарата на основе меченного технецием-99m каркасного протеина $\text{DARPin}(\text{HE})_3\text{-G3}$ и сопоставление его накопления с основными клинικο-морфологическими параметрами, эффективностью предоперационной терапии и выживаемостью.

Для решения поставленных задач на клиническом материале проводился комплексный анализ, включающий определение оптимальных дозировки протеина и времени исследования с препаратом $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$, а также информативных диагностических критериев для дифференцировки статуса HER2/neu в первичной опухоли у больных раком

молочной железы. Помимо этого, выполнялось сопоставление накопления $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ с основными клинико-морфологическими параметрами, эффективностью предоперационной терапии и показателями выживаемости.

Набор клинического материала осуществлялся на базе отделений консультативно-госпитального приема НИИ онкологии Томского НИМЦ, планирование дизайна исследования, статистическая обработка и анализ полученных результатов осуществлялись на базе отделения лекарственного лечения опухолей Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

В плане подготовки было получено одобрение биоэтического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №4 от 24.04.2021). Согласно Федеральному закону от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 29.12.2015) «Об обращении лекарственных средств» и приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации №1218н от 12.11.2020 «Об утверждении порядка изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов непосредственно в медицинских организациях» радиофармацевтические лекарственные препараты, изготовленные непосредственно в медицинских организациях в порядке, установленном уполномоченным федеральным органом исполнительной власти, не подлежат государственной регистрации» исследования с использованием радиофармпрепаратов для диагностики HER2-позитивных опухолей молочной железы получили одобрение приказом НИИ онкологии Томского НИМЦ №24-п от 19.02.2018. Все пациенты перед введением препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ подписывали информированное согласие.

В исследование было включено 50 больных раком молочной железы (сT2-4сN0-3сM0-1) с положительной и отрицательной экспрессией HER2/neu в первичной опухоли молочной железы до начала локального/системного лечения, проходивших обследование и лечение в период с 2020-2023 гг. Критерии включения и исключения пациентов в

исследование были стандартными. *Первый этап исследования* включал 30 больных раком молочной железы, которые были разделены на 3 группы в зависимости от используемых дозировок протеина DARPin(HE)₃-G3, равных 1000 мкг, 2000 мкг и 3000 мкг (в каждой группе у 5 пациенток была выявлена положительная экспрессия HER2/neu, у 5 – отрицательная). Проводилось определение оптимальных дозировки протеина и интервал времени после введения препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 для последующих клинических испытаний. *На втором этапе* в подгруппу с определенными на предыдущем этапе дозировкой протеина и времени исследования дополнительно были включены 20 больных раком молочной железы (суммарно 15 пациенток с положительной экспрессией HER2/neu и 15 – с отрицательной). В рамках второго этапа выполнялись определение диагностических критериев для дифференцировки статуса HER2/neu в первичной опухоли у больных раком молочной железы при использовании препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3, а также корреляция его аккумуляции с основными клинико-морфологическими параметрами, эффективностью предоперационного лечения и показателями выживаемости.

В группе больных, вошедших в первый этап исследования, преобладали пациентки возрастной группы 45 лет и старше (средний возраст больных $46,5 \pm 10,2$ лет) (53 %) с сохраненной менструальной функцией (77 %), без поражения регионарных лимфатических узлов (63 %) и ПА стадией опухолевого процесса (63 %). Помимо этого, наиболее частым молекулярно-биологическим фенотипом у вошедших в исследование пациентов являлся Люминальный В HER2-позитивный рак молочной железы (38 %).

Среди пациенток второго этапа преобладали больные в возрастной группе 45 лет и старше (средний возраст больных $49,3 \pm 11,4$ лет) (77 %) с сохраненной менструальной функцией (57 %), без вовлечения в процесс регионарных лимфатических узлов (76 %) и ПА стадией опухолевого процесса (76 %). Положительная экспрессия рецептора эстрогена

отмечалась у 63 % пациенток, отрицательная – у 37 %. Значения маркера клеточной пролифериции Ki67 менее 20 % отмечались в 20 % случаев, 20 и более процентов – в 80 %. При анализе иммуногистохимических характеристик преобладал Люминальный В HER2-позитивный молекулярно-биологический подтип рака молочной железы (30 %).

Все пациенты, вошедшие во II этап настоящего клинического наблюдения после этапа комбинированного лечения, находились на динамическом наблюдении. У 12 (40 %) пациенток отмечалось прогрессирование заболевания: в 2 (17 %) случаях – локорегионарный рецидив и в 10 (83 %) – отдаленные метастазы в висцеральные органы (50 %) и кости (50 %).

Всем больным с гиперэкспрессией HER2/neu и с тройным отрицательным фенотипом в первичной опухоли на первом этапе комбинированного лечения согласно Российским клиническим рекомендациям проводилось предоперационное системное лечение [11, 12]. Помимо этого, согласно клинической ситуации в 3 случаях Люминального В HER2-отрицательного рака также проводились курсы неоадьювантной терапии. У 9 (30 %) больных после проведения предоперационного лечения отмечалась полная морфологическая регрессия (pCR), у 14 (70 %) пациенток – остаточная опухоль (non-pCR).

Согласно Российским клиническим рекомендациям [11, 12] на этапе диагностики всем больных раком молочной железы проводилось стандартное клинко-морфологическое обследование. Во всех случаях выполнялись гистологическая верификация и ИГХ исследование ткани первичной опухоли молочной железы. Морфологическое и иммуногистохимическое исследования были проведены по стандартным методикам [163]. HER2-статус оценивался в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP от 2023 года, согласно которым отрицательной экспрессия HER2/neu считается при отсутствии окрашивания или со слабым, прерывистым мембранным окрашиванием (0 и 1+), положительной

– случаи с периферическим мембранным полным интенсивным окрашиванием более 10 % опухолевых клеток (3+). В сомнительных случаях (2+) результат будет подтверждаться амплификацией гена HER2 методом гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ДНК-зонда ERBB2(17q12)/SE17 (Kreatech, США) [163]. Оценка лечебного патоморфоза осуществлялась по системе «Residual Cancer Burden» (RCB) и по Г.А. Лавниковой по стандартным методикам [2, 9].

Наработка протеина DARPin(HE)₃-G3 для продолжения исследований у человека выполнялась в бактериальном продуценте в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУН Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством академика РАН, проф. С.М. Деева. Препарат [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 готовился непосредственно перед введением пациенту по трикарбонильной методике на базе отделения радионуклидной диагностики и терапии НИИ онкологии Томского НИМЦ с использованием трех дозировок протеина: 1000, 2000 и 3000 мкг [82, 106]. По результатам исследования средняя введенная активность препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 составляла 287 ± 30 МБк. Радиохимический выход составил 83 ± 9 %, радиохимическая чистота – 98 ± 8 %.

У всех больных раком молочной железы выполнялась однофотонная эмиссионная компьютерная томография с использованием препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в положении лежа на спине с заведенными за голову руками, в поле зрения детектора входили голова, шея, аксиллярная область и грудная клетка до уровня бифуркации трахеи и верхний этаж брюшной полости. На первом этапе исследование проводилось через 2, 4 и 6 часов после внутривенного введения препарата, на втором – через оптимальный временной интервал, определенный на первом этапе.

Анализ выполнялся на гамма-камере E.CAM 180 фирмы Siemens (Германия) с использованием параллельных высокоразрешающих коллиматоров для энергии 140 кэВ со скоростью сканирования 12 см/мин,

запись исследования производилась на матрицу 256×1024 пикселей без аппаратного увеличения по стандартному протоколу исследования. Для оценки накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 при ОФЭКТ использовался объем 3,5 см³ (volume of interest, VOI), который был очерчен на томограммах с центром на самом высоком уровне поглощения опухолью. Для достижения количественного счета данный объем копировался в проекцию зон интереса, числовые значения выражались в импульсах.

При анализе данных ОФЭКТ *на первом этапе* оценивалось накопление радиофармпрепарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в первичной опухоли молочной железы и печени у больных раком молочной железы через 2, 4 и 6 часов после введения. Дополнительно определялись оптимальные дозировка соединения и время исследования. *На втором этапе* с использованием оптимальной дозировки протеина и времени проведения исследования после введения препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3, анализировались его накопление в опухоль, контралатеральный участок противоположной молочной железы (фон), печень и широчайшую мышцу спины (ШМС), также определялись соотношения опухоль/фон, опухоль/печень и опухоль/ШМС. Выбор референсных органов основывался на результатах клинических исследований других каркасных протеинов, где большая информативность была получена при использовании параметров накопления препарата в печени и широчайшей мышце спины [119, 120].

В выполненной работе для статистической обработки результатов исследования применялись программы IBM SPSS Statistics v.20.0 и Statistica 10.0. Нормальность распределения количественных показателей проверяли с применением критерия Шапиро-Уилка. Поскольку данные не соответствовали нормальному распределению, для сравнения независимых групп использовали непараметрические методы: критерии Манна-Уитни (при сравнении двух групп) и Краскела-Уоллиса (при сравнении трёх и более групп). Результаты представлены в формате медианы (Me) с

указанием 25-го (Q1) и 75-го (Q3) квартилей. Прогностическая ценность параметров анализировалась с построением ROC-кривых. Оценку выживаемости проводили методом Каплана-Майера, для сравнения кривых выживаемости использовали лог-ранговый критерий. Во всех видах анализа порогом статистической значимости служило значение $p < 0,05$.

Применение радиофармацевтического лекарственного препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ позволяет визуализировать первичные опухоли у больных РМЖ независимо от статуса HER2/neu через 2, 4 и 6 часов после введения. Выполненный анализ аккумуляции $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в проекции первичной опухоли и печени позволил определить оптимальные для разделения опухолей молочной железы в зависимости от статуса HER2/neu дозировку протеина и временной интервал, равные 3000 мкг и 4 часам после введения ($p = 0,011$, Mann-Whitney test). Полученные результаты по накоплению препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в печени демонстрируют более низкие показатели аккумуляции препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ по сравнению с ранее изученным препаратом $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}\text{-DARPin9_29}$, что может свидетельствовать о возможности использования изучаемого соединения в оценке распространенности опухолевого процесса, а именно визуализации метастатического поражения в печени [5, 7].

Анализ накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в опухоли, контрлатеральном участке противоположной молочной железы (фон), печени и ШМС, а также соотношений опухоль/фон, опухоль/печень, опухоль/ШМС через 4 часа после введения в дозировке протеина 3000 мкг продемонстрировал, что большей статистической значимостью для разделения опухолей в зависимости от экспрессии HER2/neu обладают параметр накопления препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{HE})_3\text{-G3}$ в опухоли ($p = 0,0011$), а также соотношения опухоль/фон ($p = 0,0003$) и опухоль/ШМС ($p = 0,0218$). Данные выполненного ROC анализа в отношении обладающих статистической значимостью параметров дифференцировки статуса HER2/neu первичной опухоли при использовании препарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-$

(HE)₃-G3 у больных раком молочной железы продемонстрировали, что показатели чувствительности и специфичности составили: для накопления в опухоли – 85,71 % и 81,25 % с пороговым значением >1975 импульсов (AUC 0,08; 95 % ДИ 0,68-0,99), для соотношения опухоль/фон – 71,43 % и 87,50 % с пороговым значением > 8,31 отн. ед. (AUC 0,06; 95 % ДИ 0,73 – 0,99); для соотношение опухоль/ШМС – 75 % с пороговым значением 1,93 отн. ед. (AUC 0,09; 95 % ДИ 0,56-0,93).

В ходе выполнения работы была разработана математическая модель прогнозирования статуса HER2/neu первичной опухоли молочной железы на основе параметра накопления радиофармацевтического препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли. Модель демонстрирует высокую диагностическую эффективность: отношение шансов составило 81,00 (95 % ДИ: 5,020 – 941,2), чувствительность и специфичность достигли 81,25 % и 85,7 % ($p = 0,0001$). Уравнение логистической регрессии имело следующий вид: $Y = -5,13 + 3,258 \times X_1$, где X_1 – накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли где X_1 – накопление препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли (1 при накоплении < 1975 импульсов; 2 при ≥ 1975 импульсов).

Оценка статуса рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu в первичной опухоли определяется по формуле $P = e^Y / (1 + e^Y)$, где P – значение вероятности развития признака; Y – значение уравнения регрессии; e – математическая константа, равная 2,72. При P более или равно 50 % определяют высокую вероятность, а при P менее 50 % – низкую вероятность положительного HER2-статуса.

Выполненный анализ накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с клиничко-морфологическими параметрами не выявил связи с состоянием менструальной функции пациенток, экспрессией рецептора эстрогена и уровнем пролиферативной активности Ki67. В тоже время было определено, что аккумуляция соединения в ШМС была выше в подгруппе больных 45 лет и старше ($p = 0,0374$), а соотношение опухоль/ШМС выше у больных моложе 45 лет ($p = 0,0234$). Выявленная закономерность сохранялась только

в подгруппе больных HER2-позитивным РМЖ, в которой дополнительно была обнаружена связь возраста пациентов с соотношением накопления препарата в опухоли против печени ($p = 0,0379$). Помимо этого, значимые различия в накоплении препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 были получены у больных с размером опухоли менее 30 мм для показателей накопления в ШМС ($p = 0,0014$) и соотношения опухоль/печень ($p = 0,0374$), а также для пациентов с размером опухоли 30 мм и более для параметров накопления в печени ($p = 0,0229$) и соотношения опухоль/ШМС ($p = 0,0053$). Анализ параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 у больных с гиперэкспрессией HER2/neu статистически значимых различий не выявил, в то время как, у больных с отрицательной экспрессией HER2/neu тенденция различий была сохранена для параметров накопления в ШМС ($p = 0,0010$), а также соотношений опухоль/печень и опухоль/ШМС ($p = 0,0110$). По результатам исследования статистические различия в группах также были продемонстрированы при использовании соотношения опухоль/ШМС с большими значениями у больных без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов ($p = 0,0276$).

Дополнительно проведенная оценка связи всех изучаемых параметров накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 с молекулярно-биологическим подтипом раком молочной железы показала статистическую значимость только показателя аккумуляции в опухоли. При этом, накопление препарата было достоверно выше в HER2-позитивных подтипах (Люминальном В HER2-позитивном и гормон-негативном HER2-позитивном подтипах) ($p < 0,05$) по сравнению с Люминальным А, Люминальным В HER2-негативном и трижды негативном подтипах, что соответствовало данным, полученными на предыдущих этапах настоящего исследования.

Результаты проведенного анализа демонстрируют отсутствие статистически значимых различий между группами pCR и non-pCR по всем исследованным параметрам. Интересным является обнаруженный факт различия в соотношении накопления опухоль/ШМС при анализе групп

больных раком молочной железы с наличием или отсутствием отдаленных метастазов, возникших в период наблюдения. Большее соотношение опухоль/ШМС было обнаружено у пациентов с развившимися гематогенными метастазами (5,09 (2,61 – 8,12)) по сравнению с пациентами без метастазов (1,05 (0,83 – 3,37), $p = 0,028$).

Проведение ROC-анализа показало, что соотношение опухоль/ШМС обладает высокой прогностической ценностью ($AUC = 0,75$ (95 % ДИ 0,55 – 0,95)). Было показано, что использование порогового значения соотношения опухоль/ШМС $\geq 2,12$ отн. ед. позволяет с чувствительностью 70% и специфичностью 90% прогнозировать развитие гематогенных метастазов в отдаленном периоде у больных РМЖ ($p = 0,028$).

Далее, была проанализирована безметастатическая и бессобытийная выживаемость в зависимости от параметров накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли и от клинико-морфологических параметров. Оценка показала, что ни HER2 статус по ИГХ, ни пороговое значение накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли не связаны с безметастатической и бессобытийной выживаемостью. В тоже время, анализ безметастатической выживаемости больных РМЖ в зависимости от обнаруженного прогностического порогового значения соотношения опухоль/ШМС равного 2,12 отн. ед. позволил выявить достоверную связь. Больные, имеющие соотношение накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли против ШМС выше 2,12 отн. ед., демонстрировали безметастатическую выживаемость на конец наблюдения, равную 40,0 %. В тоже время больные со значениями ниже порогового значения – 93,3% ($p = 0,0019$). Для более полного анализа показателей безметастатической выживаемости дополнительно был проведен Кокс-регрессионный анализ.

В ходе однофакторного анализа выживаемости было установлено, что превышение порогового значения соотношения накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли по отношению к ШМС ($\geq 2,12$ отн. ед.) ассоциировано со значительным увеличением риска неблагоприятного

исхода. Так, при значении показателя $\geq 2,12$ отн. ед. риск возрастал в 12,8 раза по сравнению с группой с низким накоплением препарата (HR = 12,82 (95 % ДИ 2,39 – 236,9), $p = 0,015$). В многофакторном анализе данный параметр сохранил статистическую значимость (HR = 11,49 (95 % ДИ 1,03 – 355,9), $p = 0,035$), что указывает на его независимую прогностическую ценность. Экспрессия HER2 по ИГХ не продемонстрировала статистически значимой связи с прогнозом: при HER2-положительном статусе HR составил 1,91 (95 % ДИ 0,54 – 7,49, $p = 0,315$).

Оценка влияния неоадьювантной химиотерапии показала, что достижение pCR не ассоциировалось с улучшением прогноза ни в однофакторном (HR = 0,92 (95 % ДИ 0,02 – 23,3), $p = 0,951$), ни в многофакторном анализе (HR = 0,21 (95 % ДИ 0,006 – 7,94), $p = 0,847$). В то же время отсутствие pCR (non-pCR) в однофакторной модели сопровождалось статистически значимым увеличением риска неблагоприятного исхода (HR = 8,95 (95% ДИ 1,62 – 166,8), $p = 0,039$), однако в многофакторной модели данный параметр утрачивал достоверность (HR = 1,32 (95% ДИ 0,11 – 49,02), $p = 0,371$).

Таким образом, по результатам проведенного исследования радиофармацевтический лекарственный препарат [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в дозировке протеина 3000 мкг с проведением исследования через 4 часа после введения продемонстрировал возможность дифференцировки статуса HER2/neu у больных раком молочной железы с учетом параметра накопления в опухоли 1975 импульсов с показателями чувствительности и специфичности, равными 85,71 % и 81,25 % соответственно.

Впервые проведенное исследование показало связь накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 с некоторыми клинико-морфологическими параметрами у больных РМЖ. Так, связь накопления [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли с возрастом была выявлена только у больных HER2-позитивным РМЖ. Связь накопления препарата с размером опухоли обнаружена только в группе с HER2-негативным статусом, что косвенно указывает на высокую

специфичность исследуемого препарата, а корреляция соотношения опухоль/ШМС со стадией заболевания отражает общую тенденцию более агрессивного поведения HER2-позитивного РМЖ.

В настоящем исследовании было продемонстрировано, что соотношение накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли против ШМС является клинически значимым прогностическим показателем, обладающим высокой чувствительностью (70%) и специфичностью (90%). Выбранное пороговое значение $\geq 2,12$ отн. ед. позволило выделить группу пациентов с существенно более высоким риском неблагоприятного исхода. Сохранение статистической значимости данного параметра в многофакторном анализе подтверждает его независимую прогностическую роль и указывает на то, что функциональные характеристики накопления препарата могут превосходить традиционные морфологические маркеры. Отсутствие достоверной связи между ИГХ-статусом HER2 и прогнозом подчеркивает потенциальные ограничения иммуногистохимической оценки как единственного критерия стратификации риска. В этом контексте визуализация и количественная оценка накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 отражают не только уровень экспрессии рецептора, но и его биологическую доступность *in vivo*, что может объяснять выявленное расхождение между ИГХ-данными и результатами радионуклидного анализа.

Несмотря на то, что отсутствие полного патоморфологического ответа на НАХТ ассоциировалось с ухудшением прогноза в однофакторном анализе, данный показатель не продемонстрировал независимой прогностической значимости. Это может свидетельствовать о том, что эффективность НАХТ опосредована другими биологическими факторами, в том числе особенностями накопления таргетного радиофармацевтического препарата. Метастатическое поражение лимфатических узлов, традиционно рассматриваемое как неблагоприятный фактор, в представленном

исследовании не достигли статистической значимости, что, вероятно, связано с ограниченным размером выборки.

Полученные результаты указывают на перспективность таргетной радионуклидной детекции с использованием препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 и диктуют необходимость расширения объема исследования с увеличением количества пациентов с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов и отдаленными метастазами различных локализаций). Помимо этого, существенным результатом настоящего исследования является определение соотношения накопления препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в опухоли и ШМС с пороговым значением 2,12 отн. ед. в качестве независимого прогностического маркера и инструмента персонализированной оценки безметастатической выживаемости у больных РМЖ. При этом, при дальнейшем рассмотрении помимо теоретических знаний, в рамках тераностического подхода данные группы пациентов могут получить потенциально более высокую эффективность от назначения таргетной радионуклидной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Более высокая аккумуляция радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 в опухолях молочной железы с гиперэкспрессией HER2/неу отмечается при использовании протеина в дозировке 3000 мкг с проведением исследования через 4 часа после введения ($p < 0,05$, Mann-Whitney test).

2. Наиболее информативным критерием для дифференцировки статуса HER2/неу в первичной опухоли больных раком молочной железы при использовании радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 является параметр накопления в опухоли при пороговом значении 1975 импульсов с показателями чувствительности и специфичности 85,71 % и 81,25 %.

3. Уровень накопления радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 связан с возрастом пациентов, размером первичной опухоли, стадией заболевания, а также молекулярно-биологическим подтипом у больных раком молочной железы ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test).

4. Накопление радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3 на данном этапе исследования не коррелирует с эффективностью предоперационного системного лечения у больных раком молочной железы.

5. Пороговое значение соотношения опухоль/ШМС $\geq 2,12$ отн. ед. с чувствительностью и специфичностью 70 % и 90 % прогнозирует высокий риск развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы при использовании радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE) $_3$ -G3.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Показатель накопления в опухоли с пороговым значением 1975 импульсов (чувствительность 85,71 % и специфичность 81,25 %) является наиболее информативными параметром для дифференцировки статуса HER2/neu у больных раком молочной железы при применении радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3 в дозировке протеина 3000 мкг с выполнением исследования через 4 часа после введения.

2. Пороговое значение соотношения опухоль/ШМС $\geq 2,12$ отн. ед. с чувствительностью и специфичностью 70 % и 90 % прогнозирует высокий риск развития гематогенных метастазов у больных раком молочной железы при использовании радиофармацевтического лекарственного препарата [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКБ	– альтернативный каркасный белок
БРВ	– безрецидивная выживаемость
ВБП	– выживаемость без прогрессирования
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГХ	– иммуногистохимический
КТ	– компьютерная томография
МБк	– мегабеккерель
мкАТ	– моноклональное антитело
мкг	– микрограммы
НАХТ	– неоадьювантная химиотерапия
НИИ	– научно-исследовательский институт
О	– опухоль
О/П	– соотношение опухоль/печень
О/Ф	– соотношение опухоль/фон
О/ШМС	– соотношение опухоль/ широчайшая мышца спины
ОВ	– общая выживаемость
ОГК	– органы грудной клетки
ОФЭКТ	– однофотонная эмиссионная компьютерная томография
ПМР	– полная морфологическая регрессия
ПЭТ	– позитронно-эмиссионная томография
РАА	– раково-ассоциированный антиген
РМЖ	– рак молочной железы
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РП	– рецепторы прогестерона
РФЛП	– радиофармацевтический лекарственный препарат
РЭ	– рецепторы эстрогенов
ШМС	– широчайшая мышца спины

ABY-025	– (Affibody) молекулы аффибоди
ADAPT6	– (ABD – Derived Affinity Proteins) альбуминсвязывающий домен протеина стрептококка G
DARPin	– (Designed Ankyrin Repeat Proteins) естественные анкириновые повторы
EGF	– (Epidermal Growth Factor) эпидермальный фактор роста
EGFR	– (Epidermal Growth Factor Receptor) рецептор эпидермального фактора роста
Fab	– (fragment antigen binding) фрагмент молекулы иммуноглобулина
FDA	– (U.S. Food and Drug Administration)
FISH	– (Fluorescence in situ hybridization) флуоресцентная гибридизация in situ
HER2/neu	– (human epidermal growth factor receptor 2) рецепторы эпидермального фактора роста 2-го типа
Ig	– (immunoglobulin) иммуноглобулин
MAPK	– (Mitogen-activated protein kinase) митогенактивируемая протеинкиназа
PI3K	– (Phosphoinositide 3-kinase) фосфатидилинозитол-3-киназа
PCK	– (protein kinase 3) протеинкиназа 3
RUSSCO	– Российское общество клинической онкологии
scFv	– (single-chain variable fragment) одноцепочечные переменные фрагменты

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Г. А. Здравоохранение в России / Г. А. Александрова, Р. Р. Ахметзянова, Н. А. Голубев [и др.] // Стат.сб. Росстат. – 2023. – С. 25–62.
2. Андреева, Ю. Ю. Методика исследования операционного материала при раке молочной железы после неoadъювантной терапии для оценки остаточной опухолевой нагрузки (по системе RCB) / Ю. Ю. Андреева, А. В. Москвитина, Т. А. Березина [и др.] // Архив патологии. – 2016. – № 2. – С. 41–46.
3. Брагина, О. Д. Клинические возможности диагностики HER2-позитивного рака молочной железы с применением альтернативных каркасных белков / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, С. М. Деев [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2022. – Т. 21, № 3. – С. 132–139.
4. Брагина, О. Д. Результаты I фазы клинического исследования нового радиофармпрепарата на основе меченных ^{99m}Tc технецием рекомбинантных адресных молекул DARPin9_29 для радионуклидной диагностики рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2/neu / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, М. С. Ларькина [и др.] // Молекулярная медицина. – 2021. – Т. 19, № 2. – С. 41–48.
5. Брагина, О. Д. Однофотонная эмиссионная компьютерная томография с ^{99m}Tc -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 [и др.] // Молекулярная медицина. – 2021. – Т. 19, № 1. – С. 41–46.
6. Брагина, О. Д. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, Р. В. Зельчан [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 125–133.
7. Брагина, О. Д. Возможности радионуклидной диагностики Her2-позитивного рака молочной железы с использованием меченных

- технецием-99m таргетных молекул: первый опыт клинического применения / О. Д. Брагина, В. И. Чернов, Е. Ю. Гарбуков [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 23–30.
8. Деев, С. М. Разработка адресной системы на основе анти-HER2-скаффолдов и молекулярной пары барназа-барстар для ступенчатой доставки цитотоксинов при терапии HER2-положительных злокачественных новообразований / С. М. Деев, О. Н. Шилова // Acta Naturae. – 2019. – Т. 11, № 4. – С. 42–53.
 9. Лисаева, А. А. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей: клинические и морфологические критерии. Классификации. Прогностическое значение лечебного патоморфоза при раке молочной железы и других опухолях // А. А. Лисаева, Я. В. Вишневская, Е. М. Рощина [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2011. – № 4. – С. 19–23.
 10. Трякин, А. А. Общие принципы проведения противоопухолевой лекарственной терапии / А. А. Трякин, Н. С. Бесова, Н. М. Волков // Практические рекомендации RUSSCO. Злокачественные опухоли. – 2023. – Т. 13, № 2. – С. 28–41.
 11. Тюляндин, С. А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы // С. А. Тюляндин, Е. В. Артамонова, Л. Г. Жукова [и др.] // Злокачественные опухоли. Практические рекомендации RUSSCO. – 2022. – Т. 12. – С. 155–197.
 12. Тюляндин, С. А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы / С. А. Тюляндин, Е. В. Артамонова, А. Н. Жигулев [и др.] // Практические рекомендации RUSSCO. Злокачественные опухоли. – 2023. – Т. 13, № 1. – С. 157–200.
 13. Чернов, В. И. Ядерная медицина в диагностике и адресной терапии злокачественных новообразований / В. И. Чернов, А. А. Медведева, И. Г. Синилкин // Бюллетень сибирской медицины. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 220–231.

14. Agersborg, S. Immunohistochemistry and alternative FISH testing in breast cancer with HER2 equivocal amplification / S. Agersborg, C. Mixon, T. Nguyen // *Breast Cancer Res Treat.* – 2018. – Vol. 170, №2. – P. 321–328.
15. Ahn, S. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation / S. Ahn, J. W. Woo, K. Lee [et al.] // *J. Pathol. Transl. Med.* – 2020. – Vol. 54, № 1. – P. 34–44.
16. Alhuseinalkhudhur, A. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Targeting [⁶⁸Ga]Ga-ABY-025 PET/CT Predicts Early Metabolic Response in Metastatic Breast Cancer / A. Alhuseinalkhudhur, H. Lindman, P. Liss [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 2023. – №. 64. – P. 1364–1370.
17. Aurilio, G. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases / G. Aurilio // *Eur J Cancer.* – 2014. – Vol. 50, №. 2. – P. 277–289.
18. Bardia, A. HER2-Low Breast Cancer-Diagnostic Challenges and Opportunities for Insights from Ongoing Studies: A Podcast / A. Bardia, G. Viale // *Target Oncol.* – 2023. – Vol. 18, №. 3. – P. 313–319.
19. Baselga, J. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy / J. Baselga, K. A. Gelmon, S. Verma [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2010. – Vol. 28, №7. – P. 1138–44.
20. Baum, R. P. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic ¹¹¹In- or ⁶⁸Ga-labeled affibody molecules / R. P. Baum, V. Prasad, D. Müller [et al.] // *J Nucl Med.* – 2010. – Vol. 51, № 6. – P. 892-897.
21. Behr, T. M. Hert of Darkness: The Downside of Trastuzumab / T. M. Behr, M. Behe, B. Wormann // *The New England Journal of Medicine.* – 2001. – Vol. 345, № 13 – P. 995–6.
22. Bertsimas, D. Personalized Breast Cancer Screening / D. Bertsimas, Y. Ma, O. Nohadani // *JCO Clin Cancer Inform.* – 2023. – Vol.7. – P. 23000–26.

23. Beylergil, V. Pilot study of ^{68}Ga -DOTA-F (ab')₂-trastuzumab in patients with breast cancer / V. Beylergil, P. G. Morris, P. M. Smith-Jones [et al.] // Nucl Med Commun. – 2013. Vol. 34, № 12 – P. 1157–1165.
24. Bo, W. Impact of the 2018 ASCO/CAP guidelines on HER2 fluorescence in situ hybridization interpretation in invasive breast cancers with immunohistochemically equivocal results / W. Bo, W. Ding, K. Sun [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – P. 16726.
25. Bodei, L. Radiotheranostics in oncology: Current challenges and emerging opportunities / L. Bodei, K. Herrmann, H. Schoder [et al.] // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2022. – Vol. 19. – P. 534–550.
26. Bragina, O. Phase I clinical evaluation of ($^{99\text{m}}$)Tc-labeled Affibody molecule for imaging HER2 expression in breast cancer / O. Bragina, V. Chernov, M. Larkina [et al.] // Theranostics. – 2023. – Vol. 13. – P. 4858–4871.
27. Bragina, O. Direct intra-patient comparison of scaffold protein-based tracers, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ADAPT6 and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(HE)3-G3, FOR imaging of HER2-positive breast cancer / O. Bragina, V. Chernov, A. Schulga [et al.] // Cancers. – 2023. – Vol. 15, №12. – P. 3149.
28. Bragina, O. Phase I trial of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(HE)3-G3 a DARPIN-based probe for imaging of HER2 expression in breast cancer / O. Bragina, V. Chernov, R. Zelchan [et al.] // Journal of Nuclear Medicine. – 2022. – Vol. 63, № 4. – P. 528–535.
29. Bragina, O. D. The evolution of targeted radionuclide diagnosis of HER2-positive breast cancer / O. D. Bragina, S. M. Deyev, V. I. Chernov [et al.] // Acta Naturae. – 2022. – Vol. 14, № 2. – P. 4–15.
30. Bragina, O. D. Study of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ADAPT6, a Scaffold Protein-Based Probe for Visualization of HER2 Expression in Breast Cancer / O. D. Bragina, E. V. Witting, J. Garousi [et al.] // Phase I J Nucl Med. – 2021. – Vol. 62, №4. – P. 493–499.
31. Broughton, M. N. Specific antibodies and sensitive immunoassays for the human epidermal growth factor receptors (HER2, HER3, and HER4) /

- M. N. Broughton, A. Westgaard, E. Paus [et al.] // *Tumour Biol.* – 2017. – Vol. 39, № 6. – P. 1010428317707436.
32. Cantini, L. Neoadjuvant therapy in hormone Receptor-Positive/HER2-Negative breast cancer / L. Cantini, D. Trapani, L. Guidi [et al.] // *Cancer Treat Rev.* – 2024. – Vol. 123. – P. 102669.
 33. Cortés, J. Trastuzumab deruxtecan versus trastuzumab emtansine for breast cancer / J. Cortés, S. B. Kim, W. P. Chung [et al.] // *N Engl J Med.* – 2022. Vol. 386, №12. – P. 1143–1154.
 34. Coudert, B. Use of [^{18}F]-FDG PET to predict response to neoadjuvant trastuzumab and docetaxel in patients with HER2- positive breast cancer, and addition of bevacizumab to neoadjuvant trastuzumab and docetaxel in [^{18}F]-FDG PET-predicted non-responders (AVATAXHER): an open-label, randomised phase 2 trial / B. Couder, J. Pierga, M. Mouret-Reynier [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol. 15. – P. 1493–1502.
 35. Cronin, K. A. Population-based estimate of the prevalence of HER-2 positive breast cancer tumors for early-stage patients in the US / K. A. Cronin, L. C. Harlan, K. W. Dodd [et al.] // *Cancer Investig.* – 2010. – № 28. – P. 963–968.
 36. Denkert, C. Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: Pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials / C. Denkert, F. Seither, A. Schneeweiss [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2021. – Vol. 22. – P. 1151–1161.
 37. Deyev, S. M. Preclinical Evaluation of HER2-Targeting DARPIn G3: Impact of Albumin-Binding Domain (ABD) Fusion / S. M. Deyev, M. Oroujeni, J. Garousi [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2024. Vol. 25, №8. – P. 4246.
 38. Dijkers, E. C. Biodistribution of ^{89}Zr -trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer / E. C. Dijkers, T. H. Oude Munnink, J. G. Kosterink [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 2010. – Vol. 87, № 5. – P. 586–92.

39. Duffy, M. J. Clinical use of biomarkers in breast cancer: updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM) / M. J. Duffy, N. Harbeck, M. Nap [et al.] // *Eur J Cancer*. – 2017. – Vol. 75. – P. 284–298.
40. Eissler, N. Affibody PET Imaging of HER2-Expressing Cancers as a Key to Guide HER2-Targeted Therapy / N. Eissler, R. Altena, A. Alhuseinalkhudhur [et al.] // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12, №5. – P. 1088.
41. Fernandez, A. I. Examination of low ERBB2 protein expression in breast cancer tissue / A. I. Fernandez, M. Liu, A. Bellizzi [et al.] // *JAMA Oncol*. – 2022. – Vol. 8. – P. 607–614.
42. Filho, O. M. Impact of HER2 Heterogeneity on Treatment Response of Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer: Phase II Neoadjuvant Clinical Trial of T-DM1 Combined with Pertuzumab / O. M. Filho, G. Viale, S. Stein [et al.] // *Cancer Discov*. – 2021. – Vol. 11. – P. 2474–2487.
43. Fuentes, J. D. Global Stage Distribution of Breast Cancer at Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis / J. D. Fuentes, E. Morgan, A. L. Aguilar [et al.] // *AMA Oncol*. – 2024. – Vol. 10, № 1. – P. 71–78.
44. Furrer, D. Concordance of HER2 Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization Using Tissue Microarray in Breast Cancer / D. Furrer, S. Jacob, C. Caron [et al.] // *Anticancer Res*. – 2017. – Vol. 37, № 6. – P. 3323–3329.
45. Gabriele, F. Recent Advances on Affibody- and DARPin-Conjugated Nanomaterials in Cancer Therapy / F. Gabriele, M. Palerma, R. Ippoliti [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2023. – Vol. 24, № 10. – P. 8680.
46. Gallivanone, F. Targeted radionuclide therapy: frontiers in theranostics / F. Gallivanone, M. Valente, A. Savi [et al.] // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2017. Vol. 22, №10. – P. 1750–1759.
47. Garousi, J. Imaging using radiolabelled targeted proteins: radioimmunodetection and beyond / J. Garousi, S. Lindbo, J. Borin [et al.] // *EJNMMI Radiopharm Chem*. – 2019. – Vol. 134. – P. 37–48.

48. Gebauer, M. Engineering of binding functions into proteins / M. Gebauer, A. Skerra // *Curr Opin Biotechnol.* – 2019. – Vol. 60. – P. 230–241.
49. Gebhart, G. ¹⁸F-FDG PET/CT for early prediction of response to neoadjuvant lapatinib, trastuzumab, and their combination in HER2-positive breast cancer: results from Neo-ALTTO / G. Gebhart, C. Gámez, E. Holmes [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 2013. – Vol. 54. – P. 1862–1868.
50. Gebhart, G. Imaging Diagnostic and Therapeutic Targets: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 / G. Gebhart, P. Flamen, E. G. De Vries [et al.] // *J Nucl Med.* – 2016. – Vol. 1. – P.81–88.
51. Gebhart, G. 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 [et al.] // *Ann Oncol.* – 2016. – Vol. 27, № 4. – P. 619–24.
52. Gianni, L. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial / L. Gianni, T. Pienkowski, Y. H. Im [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 25–32.
53. Giovan, P. Hereditary breast and ovarian cancer: from genes to molecular targeted therapies / P. Giovan, C. De Angelis, R. Ponti [et al.] // *Crit Rev Clin Lab Sci.* – 2023. – Vol. 60, № 8. – P. 640–650.
54. Giugliano, F. Unlocking the Resistance to Anti-HER2 Treatments in Breast Cancer: The Issue of HER2 Spatial Distribution / F. Giugliano, A. Carnevale, C. Corti [et al.] // *Cancers.* – 2023. – Vol. 15. – P. 1385.
55. Grassini, D. Unusual Patterns of HER2 Expression in Breast Cancer: Insights and Perspectives / D. Grassini, E. Cascardi, I. Sarotto, [et al.] // *Pathobiology.* – 2022. – Vol. 89. – P. 278–296.

56. Griguolo, G. Interaction of host immunity with HER2-targeted treatment and tumor heterogeneity in HER2-positive breast cancer / G. Griguolo, T. Pascual, M. V. Dieci [et al.] // *J Immunother Cancer*. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 90.
57. Gutierrez, C. HER2: Biology, detection, and clinical implications / C. Gutierrez., R. Schiff // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2011. – Vol. 135. – P. 55–62.
58. Hadadi, A. The Genomic Landscape of Urothelial Carcinoma with High and Low ERBB2 Expression / A. Hadadi, H. B. Krause, A. Elliott [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15, № 24. – P. 5721.
59. Han, L. Relationship of Epidermal Growth Factor Receptor Expression with Clinical Symptoms and Metastasis of Invasive Breast Cancer / L. Han, L. Li, N. Wang [et al.] // *Interferon Cytokine Res.* – 2018. – Vol. 38, № 12. – P. 578–582.
60. Hanack, K. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies / K. Hanack, K. Messerschmidt, M. Listek // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2016. - Vol. 917. - P. 11–22.
61. Hayes, D. F. HER2 and Breast Cancer—A Phenomenal Success Story / D. F. Hayes // *N. Engl. J. Med.* – 2019. – Vol. 381. – P. 1284–1286.
62. Hein, A. Prognostic effect of low-level HER2 expression in patients with clinically negative HER2 status / A. Hein, A. D. Hartkopf, J. Emons [et al.] // *Eur J Cancer*. – 2021. – Vol. 155. – P. 1-12.
63. Hou, Y. HER2 Intratumoral Heterogeneity in Breast Cancer, an Evolving Concept / Y. Hou, H. Nitta, Z. Li // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15. – P. 2664.
64. Hoxha, I. Breast Cancer and Lifestyle Factors: Umbrella Review Hematol / I. Hoxha, F. Sadiku, L. Hoxha [et al.] // *Oncol Clin North Am.* – 2024. – Vol. 38, № 1. – P. 137–170.
65. Indini, A. Trastuzumab Deruxtecan: Changing the Destiny of HER2 Expressing Solid Tumors / A. Indini, E. Rijavec, F. Grossi // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 9. – P. 4774.

66. Ismailoglu, F. Heterogeneous Domain Adaptation for IHC Classification of Breast Cancer Subtypes / F. Ismailoglu, R. Cavill, E. Smirnov [et al.] // IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform. – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 347–353.
67. Jadvar, H. Radiotheranostics in Cancer Diagnosis and Management / H. Jadvar, X. Chen, W. Cai [et al.] // Radiology. – 2018. – Vol. 286, № 2. – P. 388–400.
68. Joensuu, H. Long-Term Outcomes of Adjuvant Trastuzumab for 9 Weeks or 1 Year for ERBB2-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of the SOLD Randomized Clinical Trial / H. Joensuu, J. Fraser, H. Wildiers [et al.] // JAMA Netw Open. – 2024. – Vol. 7, № 8. – P. 2429772.
69. Jong, S. A. Artificial Intelligence in Breast Cancer Diagnosis and Personalized Medicine / S. A. Jong, S. Shin, S. A. Yang [et al.] // J Breast Cancer. – 2023. – Vol. 26, № 5. – P. 405–435.
70. Karsten, L. Bivalent EGFR-Targeting DARPIn-MMAE Conjugates / L. Karsten, N. Janson, V. Le Joncour [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. Vol. 23, № 5. – P. 2468.
71. Keyaerts, M. Phase I Study of ⁶⁸Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma / M. Keyaerts, C. Xavier, J. Heemskerk [et al.] // J Nucl Med. – 2016. – Vol. 57, № 1. – P. 27–33.
72. Keyaerts, M. Phase II trial of HER2-PET/CT using ⁶⁸Ga-anti-HER2 VHH1 for characterization of HER2 presence in brain metastases of breast cancer patients / M. Keyaerts, C. Xavier, H. Everaet // Annals of oncology. – 2019. – Vol. 30, Suppl. 3. – P. III25–III26.
73. Kijanka, M. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors / M. Kijanka, B. Dorresteyn, S. Oliveira [et al.] // Nanomedicine (Lond). – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. 161–74.
74. Ko, F. P. Non-antibody protein-based biosensors / P. F. Ko // Essays Biochem. – 2016. – Vol. 60, № 1. – P. 19–25.

- 75.Krasniqi, A. Same-Day Imaging Using Small Proteins: Clinical Experience and Translational Prospects in Oncology / A. Krasniqi, D. M. Huyvetter, N. Devoogdt [et al.] // J Nucl Med. – 2018. – Vol. 59, № 6. – P. 885–891.
- 76.Kroigard, A. B. Molecular Concordance between Primary Breast cancer and Matched metastases // A. B. Kroigard, M. J. Larsen, M. Thomassen [et al.] // Breast J. – 2016. – Vol. 22, № 4. – P. 420–430.
- 77.Krop, I. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline focused update // I. Krop, N. Ismaila, F. Andre [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2017. – Vol. 35, № 24. – P. 2838–2847.
- 78.Kunte, S. Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer / S. Kunte, J. Abraham, A. J. Montero // Cancer. – 2020. – Vol. 126. – P. 4278–4288.
- 79.Larkina, M. Comparative Preclinical Evaluation of Peptide-Based Chelators for the Labeling of DARPIn G3 with ^{99m}Tc for Radionuclide Imaging of HER2 Expression in Cancer / M. Larkina, E. Plotnikov, E. Bezverkhniaia [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23, № 21. – P. 13443.
- 80.Leka, O. A DARPIn promotes faster onset of botulinum neurotoxin A1 action / O. Leka, Y. Wu, G. Zanetti [et al.] // Nat Commun. – 2023. – Vol. 14, № 1. – P. 8317.
- 81.Li, L. SPECT/CT Imaging of the Novel HER2-Targeted Peptide Probe ^{99m}Tc -HYNIC-H6F in Breast Cancer Mouse Models / L. Li, Y. Wu, Z. Wang [et al.] // J Nucl Med. – 2017. – Vol. 58, № 5. – P. 821–826.
- 82.Lipowska, M. First evaluation of a ^{99m}Tc -tricarbonyl complex, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{LAN})$, as a new renal radiopharmaceutical in humans / M. Lipowska, H. He, E. Malveaux [et al.] // J. Nucl. Med. – 2006. – Vol. 47, № 6. – P. 1032–1040.
- 83.Lin, N. Phase II study of lapatinib in combination with trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2–positive metastatic

- breast cancer: clinical outcomes and predictive value of early [^{18}F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography imaging (TBCRC 003) / N. Lin, H. Guo, J. Yap [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2015. – Vol. 33. – P. 2623–2631.
- 84.Liu, M. A direct immunohistochemistry (IHC) method improves the intraoperative diagnosis of breast papillary lesions including breast cancer / M. Liu, S. Q. Zhao, L. Yang [et al.] // Discov Med. – 2019. – Vol. 28, № 151. – P. 29–37.
- 85.Ljungberg, M. SPECT/CT: an update on technological developments and clinical applications / M. Ljungberg, P. H. Pretorius // Br J Radiol. – 2018. – Vol. 91, № 1081. – P. 20160402.
- 86.Lower, E.E. Discordance of the estrogen receptor and HER-2/neu in breast cancer from primary lesion to first and second metastatic site / E. E. Lower, S. Khan, D. Kennedy [et al.] // Breast Cancer (Dove Med Press). – 2017. – Vol. 9. – P. 515-520.
- 87.Lu, K. Intratumoral and intertumoral heterogeneity drives EGFR treatment considerations / K. Lu, H. Husain // J Thorac Dis. – 2022. – Vol. 14, № 5. – P. 1299–1301.
- 88.MacNeil, I. A. New HER2-negative breast cancer subtype responsive to anti-HER2 therapy identified / I. A. MacNeil, D. J. Burns, B. E. Rich [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2020. – Vol. 146. – P. 605–619.
- 89.Marchio, C. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. / C. Marchio, L. Annaratone, A. Marques [et al.] // Semin. Cancer Biol. – 2021. – Vol. 72. – P. 123–135.
- 90.Marra, A. Management of patients with advanced-stage HER2-positive breast cancer: current evidence and future perspectives / A. Marra, S. Chandarlapaty, S. Modi // Nat Rev Clin Oncol. – 2024. – Vol. 21, № 3. – P. 185–202.
- 91.Marshall, D. A. Adherence to human epidermal growth factor receptor-2 testing and adjuvant trastuzumab treatment guidelines in Ontario

- / D. A. Marshall, I. L. Ferrusi, M. Trudeau [et al.] // J Oncol Pharm Pract. – 2020. – Vol. 26, № 2. – P. 379–385.
92. Martin, H. L. Non-immunoglobulin scaffold proteins: Precision tools for studying protein-protein interactions in cancer / H. L. Martin, R. Bedford, S. J. Heseltine // Biotechnol. – 2018. – Vol. 45. – P. 28–35.
 93. Massicano, A. V. F. Targeting HER2 in Nuclear Medicine for Imaging and Therapy / A. V. F. Massicano, B. V. Marquez-Nostra, S. E. Lapi // Mol Imaging. – 2018. – Vol. 17. – P. 1536012117745386.
 94. Meric-Bernstam, F. Advances in HER2-Targeted Therapy: Novel Agents and Opportunities Beyond Breast and Gastric Cancer / F. Meric-Bernstam, A. M. Johnson, E. E. I. Dumbrava [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2019. – Vol. 25. – P. 2033–2041.
 95. Miglietta, F. Evolution of HER2-low expression from primary to recurrent breast cancer / F. Miglietta, G. Griguolo, M. Bottosso [et al.] // NPJ Breast Cancer. – 2021. – Vol. 7. – P. 137.
 96. Modi, S. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer / S. Modi, C. Saura, T. Yamashita [et al.] // N Engl J Med. – 2020. – Vol. 382, № 7. – P. 610–621.
 97. Morganti, S. Loss of HER2 in breast cancer: Biological mechanisms and technical pitfalls / S. Morganti, M. Ivanova, E. Ferraro [et al.] // Cancer Drug Resist. – 2022. Vol. 5. – P. 971–980.
 98. Mortimer, J. E. Functional Imaging of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer Using ⁶⁴Cu-DOTA-Trastuzumab PET / J. E. Mortimer, J. R. Balding, D. M. Colcher [et al.] // J. Nucl. Med. – 2014. – Vol. 55, №1. – P. 23–9.
 99. Moutafi, M. Quantitative measurement of HER2 expression to subclassify ERBB2 unamplified breast cancer / M. Moutafi, C. J. Robbins, V. Yaghoobi [et al.] // Lab Invest. – 2020. – Vol. 102. – P. 1101–1108.
 100. Moy, B. Chemotherapy and targeted therapy for human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer that is either

- endocrine-pretreated or hormone receptor-negative: ASCO guideline rapid recommendation update / B. Moy, R. B. Rumble, L. A. Carey [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2022. – Vol. 40. – P. 3088–3090.
101. Mueller, C. Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research / C. Mueller, A. Haymond, J. B. Davis [et al.] // *Expert Rev Proteomics.* – 2018. – Vol. 15, № 2. – P. 131–152.
 102. Muller K. E. Pathologic Features and Clinical Implications of Breast Cancer with HER2 Intratumoral Genetic Heterogeneity / K. E. Muller, J. D. Marotti, L. J. Tafe // *Am J Clin Pathol.* – 2019. – Vol. 152, № 1. – P. 7–16.
 103. Nagini, S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players / S. Nagini // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2017. – Vol. 17. – P. 152–163.
 104. Novoselova, M. V. Polymer/magnetite carriers functionalized by HER2-DARPin: Avoiding lysosomes during internalization and controlled toxicity of doxorubicin by focused ultrasound induced release / M. V. Novoselova, E. I. Shramova, O. V. Sergeeva [et al.] // *Nanomedicine.* – 2023. – Vol. 47. – P. 102612.
 105. Ocaña, A. HER2 heterogeneity and resistance to anti-HER2 antibody-drug conjugates / A. Ocaña, E. Amir, A. Pandiella // *Breast Cancer Res.* – 2020. – Vol. 22, № 1. – P. 15.
 106. Orlova, A. $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+-(\text{HE})_3\text{-ZIGF1R:4551}$, a new Affibody conjugate for visualization of insulin-like growth factor-1 receptor expression in malignant tumours / A. Orlova, C. Hofström, J. Strand [et al.] // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2013. – Vol. 40, № 3. – P. 439–449.
 107. Ovacik, M. Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development / M. Ovacik, K. Lin // *Clin Transl Sci.* – 2018. – Vol. 11, № 6. – P. 540–552.

108. Pandit, T. N. Targeted Radioimmunotherapy and Theranostics with Alpha Emitters / T. N. Pandit // *J Med Imaging Radiat Sci.* – 2019. – Vol. 50, № 1. – P. 41–S44.
109. Pareek, A. 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 // *J Cancer Res Ther.* – 2019. – Vol. 15, № 5. – P. 971–975.
110. Perez-Garcia, J. Chemotherapy de-escalation using an ^{18}F -FDG-PET-based pathological response-adapted strategy in patients with HER2-positive early breast cancer (PHERGain): a multicentre, randomised, open-label, non-comparative, phase 2 trial / J. Perez-Garcia, G. Gebhart., M. Ruiz Borrego [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2021. – Vol. 22. – P. 858–871.
111. Perik, P. J. Indium-111-labeled trastuzumab scintigraphy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer / P. J. Perik, M. L. Hooge., J. A. Gietema // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 20, № 15. – P. 2276–2282.
112. Pernas, S. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance / S. Pernas, S. M. Tolaney // *Ther Adv Med Oncol.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1758835919833519.
113. Plückthun, A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy / A. Plückthun // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2015. – Vol. 55. – P. 489–511.
114. Proshkina, G. DARPin_9-29-Targeted Mini Gold Nanorods Specifically Eliminate HER2-Overexpressing Cancer Cells / G. Proshkina, S. Deyev, A. Ryabova [et al.] // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2019. – Vol. 11, № 38. – P. 34645–34651.
115. Raica, M. Hormone receptors and HER2 expression in primary breast carcinoma and corresponding lymph node metastasis: do we need both? / M. Raica, A.M. Cîmpean, R.A. Ceausu [et al.] // *Anticancer Res.* – 2014. – Vol. 34, № 3. – P. 1435–40.

116. Rakha, E.A. UK recommendations for HER2 assessment in breast cancer: an update / E. A. Rakha, P. H. Tan, C. Quinn [et al.] // J Clin Pathol. – 2023. – Vol. 76, № 4. – P. 217–227.
117. Roy, M. Molecular classification of Breast Cancer // M. Roy, A. M. Fowler, G. A. Ulaner [et al.] // ET Clin. – 2023. – Vol. 14, № 4. – P. 441–458.
118. Rugo, H. S. Effect of a Proposed Trastuzumab Biosimilar Compared With Trastuzumab on Overall Response Rate in Patients With ERBB2 (HER2)-Positive Metastatic Breast Cancer: A Randomized Clinical Trial / H. S. Rugo, A. Barve, C. F. Waller [et al.] // JAMA. – 2017. – Vol. 317. – P. 37–47.
119. Sandberg, D. Intra-image referencing for simplified assessment of HER2-expression in breast cancer metastases using the Affibody molecule ABY-025 with PET and SPECT / D. Sandberg, V. Tolmachev, I. Velikyan [et al.] // Eur J Nucl Med Mol Imaging. – 2017. – Vol. 44, № 8. – P. 1337–1346.
120. Sandström, M. Biodistribution and Radiation Dosimetry of the Anti-HER2 Affibody Molecule ⁶⁸Ga-ABY-025 in Breast Cancer Patients / M. Sandström, K. Lindskog, I. Velikyan [et al.] // J Nucl Med. – 2016. – Vol. 57, № 6. – P. 867–71.
121. Saura, C. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Updated Survival Results From a Phase 2 Trial (DESTINY-Breast01) / C. Saura, S. Modi, I. Krop [et al.] // Ann Oncol. – 2024. – Vol. 35, № 3. – P. 302–307.
122. Schrijver, W. M. Receptor Conversion in Distant Breast Cancer Metastases: A Systematic Review and Meta-analysis / W. M. Schrijver, K. P. Suijkerbuijk, C. H. Gils [et al.] // J Natl Cancer Inst. – 2018. – Vol. 110, № 6. – P. 568–580.
123. Schwill, M. Systemic analysis of tyrosine kinase signaling reveals a common adaptive response program in a HER2-positive breast cancer / M. Schwill, R. Tamaskovic, A. S. Gajadhar [et al.] // Sci Signal. – 2019. – Vol. 12, № 565. – P. 2875.

124. Schneeweiss, A. Evaluating the predictive value of biomarkers for efficacy outcomes in response to pertuzumab – and trastuzumab-based therapy: an exploratory analysis of the TRYPHAENA study / A. Schneeweiss, S. Chia, R. Hegg [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2014. – Vol. 16, № 4. – P. 73.
125. Shramova, E. Dual Targeting of Cancer Cells with DARPin-Based Toxins for Overcoming Tumor Escape / E. Shramova, G. Proshkina, V. Shipunova [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12, № 10. – P. 3014.
126. Siegel, R. L. Cancer statistics, 2023 / R. L. Siegel, K. D. Miller, N. S. Wagle [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2023. – Vol. 73, № 1. – P. 17-48.
127. Sietke, B. M. ^{89}Zr -trastuzumab and ^{89}Zr -bevacizumab PET to evaluate the effect of the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in metastatic breast cancer patients / B. M. Sietke., J. Jong., P. J. Perik // *Molecular imaging.* – 2014. – Vol. 13, № 5. – P.1–6.
128. Sivelles, C. Fab is the most efficient format to express functional antibodies by yeast surface display / C. Sivelles, R. Sierocki, K. Ferreira-Pinto [et al.] // *MAbs.* – 2018. – Vol. 10, № 5. – P. 720–729.
129. Slamon, D. Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer // D. Slamon, W. Eiermann, N. Robert [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 365, № 14. – P. 1273–1283.
130. Slamon, D. J. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene / D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong [et al.] // *Science.* – 1987. – Vol. 235, № 4785. – P. 177–182.
131. Sokolova, E. A. HER2-Specific Targeted Toxin DARPin-LoPE: Immunogenicity and Antitumor Effect on Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenograft Model / E. A. Sokolova, O. N. Shilova, D. V. Kiseleva [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 10. – P. 2399.
132. Solomon, V. R. $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ labeled domain I/II-specific anti-EGFR (scFv)₂ antibody fragment for imaging EGFR expression / V. R. Solomon,

- C. Gonzalez, E. Alizadeh [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 157, № 5. – P. 437–446.
133. Sörensen, J. First-in-human molecular imaging of HER2 expression in breast cancer metastases using the ¹¹¹In-ABY-025 affibody molecule / J. Sörensen, D. Sandberg, M. Sandström [et al.] // *J Nucl Med.* – 2014. – Vol. 55, № 5. – P. 730–735.
134. Sörensen, J. Measuring HER2-Receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using [⁶⁸Ga]ABY-025 Affibody PET/CT / J. Sörensen, I. Velikyan, D. Sandberg, [et al.] // *Theranostics.* – 2016. – Vol. 6, № 2. – P. 262–271.
135. Stahl, S. Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications / S. Stahl, T. Graslund, K.A. Eriksson [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 691–712.
136. Stéen, E. J. L. Pretargeting in nuclear imaging and radionuclide therapy: Improving efficacy of theranostics and nanomedicines / E. J. L. Stéen, P. E. Edem, K. Norregaard [et al.] // *Biomaterials.* – 2018. – Vol. 179. – P. 209–245.
137. Stewart, R. L. HER2 immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization discordances in invasive breast carcinoma with micropapillary features / R. L. Stewart, J. E. Caron, E. H. Gulbahce [et al.] // *Mod Pathol.* – 2017. – Vol. 30, № 11. – P. 1561–1566.
138. Stumpp, M. T. Beyond Antibodies: The DARPin[®] Drug Platform / M. T. Stumpp, K. M. Dawson, H. K. Binz // *BioDrugs.* – 2020. – Vol. 34, № 4. – P. 423–433.
139. Sung, H. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2021. – Vol. 71, № 3. – P. 209–249.
140. Swain, S. M. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer / S. M. Swain, J. Baselga, S. B. Kim [et al.] // *N Engl J Med.* – 2015. – Vol. 372. – P. 724–34.

141. Tarantino, P. Prognostic and biologic significance of ERBB2-low expression in early-stage breast cancer / P. Tarantino, Q. Jin, N. Tayob [et al.] // JAMA Oncol. – 2022. Vol. 8. – P. 1177–1183.
142. Tarantino, P. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer / P. Tarantino, G. Viale, M. F. Press [et al.] // Ann Oncol. – 2023. – Vol. 34, № 8. – P. 645–659.
143. Tamura, K. ⁶⁴Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer / K. Tamura, H. Kurihara, K. Yonemori [et al.] // J Nucl Med. – 2013. – Vol. 54, № 11. – P. 1869–75.
144. Tesch, M. Precision medicine in extended adjuvant endocrine therapy for breast cancer / M. Tesch // Urr Opin Oncol. – 2023. – Vol. 35, №. 6. – P. 453–460.
145. Thanasan, S. Diagnostic Accuracy of Immunohistochemistry for HER2-Positive Breast Cancer Asian Pac / S. Thanasan, K. Sukhakul, S. Chitpakdee [et al.] // J Cancer Prev. – 2023. – Vol. 24, № 12. – P. 4321–4327.
146. Tolmachev, V. M. Direct in vivo comparison of ^{99m}Tc-labelled scaffold proteins, DARPInG3 and ADAPT6 for visualization of HER2 expression and monitoring of early response for trastuzumab therapy / V. M. Tolmachev, V. V. Bodenko, V. Oroujeni [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 23. – P. 15181.
147. Tolmachev, V. Molecular design of radiocopper-labelled Affibody molecules / V. Tolmachev, T. J. Grönroos, C. B. Yim [et al.] // Sci Rep. – 2018. – Vol. 8, No. 1. – P. 6542.
148. Tolmachev, V. Affibody Molecules as Targeting Vectors for PET Imaging / V. Tolmachev, A. Orlova // Cancers. – 2020. – Vol. 12. – P. 651.
149. Tolmachev, V. The emerging role of radionuclide molecular imaging of HER2 expression in breast cancer / V. Tolmachev, A. Orlova, J. Sorensen // Semin Cancr Biology. – 2021. – Vol. 12, № 34. – P. 185–197.

150. Tolmachev, V. Tumor targeting using affibody molecules: interplay of affinity, target expression level, and binding site composition / V. Tolmachev, T. A. Tran, D. Rosik [et al.] // *J Nucl Med.* – 2012. – Vol. 53, № 6. – P. 953–60.
151. Tsai, Y. F. HER2 immunohistochemical scores provide prognostic information for patients with HER2-type invasive breast cancer / Y. F. Tsai, L. M. Tseng, P. J. Lien [et al.] // *Histopathology.* – 2019. – Vol. 74, № 4. – P. 578–586.
152. Tsang, J. S. Molecular classification of Breast Cancer / J. S. Tsang, G. M. Tse // *Tse Adv Anat Pathol.* – 2020. – Vol. 27, № 1. – P. 27–35.
153. Turner, N. H. HER2 discordance between primary and metastatic breast cancer: assessing the clinical impact / N. H. Turner, L. A. Di // *Cancer Treat Rev.* – 2013. – Vol. 39, № 8. – P. 947–57.
154. Ulaner, G. A. 89Zr-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 [et al.] // *Clin Nucl Med.* – 2017. – Vol. 42, № 12. – P. 912–917.
155. Vorobyeva, A. Comparative Evaluation of Radioiodine and Technetium-Labeled DARPIn 9_29 for Radionuclide Molecular Imaging of HER2 Expression in Malignant Tumors / A. Vorobyeva, O. Bragina, M. Altai [et al.] // *Contrast Media Mol Imaging.* – 2018. – Vol. 6. – P. 6930425.
156. Vorobyeva, A. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of ^{99m}Tc-labeled DARPIn G3 / A. Vorobyeva, A. Schulga, E. Konovalova [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, No. 1. – P. 9405.
157. Waks, A. G. Breast Cancer Treatment: A Review / A. G. Waks, E. P. Winer // *JAMA.* – 2019. – Vol. 321, № 3. – P. 288–300.

158. Wesola, M. A Comparison of IHC and FISH Cytogenetic Methods in the Evaluation of HER2 Status in Breast Cancer / M. Wesola, M. Jeleń // *Adv Clin Exp Med.* – 2015. – Vol. 24, № 5. – P. 899–903.
159. Witting von, E. Selection of the optimal macrocyclic chelators for labeling with ^{111}In and ^{68}Ga improves contrast of HER2 imaging using engineered scaffold protein ADAPT6 / E. V. Witting, J. Garousi, S. Lindbo [et al.] // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2019. – Vol. 140. – P. 109–120.
160. Wolff, A. C. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update / A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, K. H. Allison [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2018. – Vol. 36. – P. 2105–2122.
161. Wolff, A. C. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update / A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, D. G. Hicks [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 3997–4013.
162. Wolff, A. C. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer / A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, J. N. Schwartz [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 118–145.
163. Wolff, A. C. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update / A. C. Wolff, M. R. Somerfield, M. Dowsett [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2023. – Vol. 41, № 22. – P. 3867–3872.
164. Xi, J. Molecular classification of hormone receptor-positive HER2-negative breast cancer / J. Xi, Y. Zhou., D. Ma [et al.] // *Nat Genet.* – 2023. – Vol. 55, № 10. – P. 1696–1708.

165. Xu, Y. PET imaging of a ^{68}Ga labeled modified HER2 affibody in breast cancers: from xenografts to patients / Y. Xu, L. Wang, D. Pan [et al.] // Br J Radiol. – 2019. – Vol. 92, № 1104. – P. 20190425.
166. Yan, M. HER2 expression status in diverse cancers: Review of results from 37,992 patients / M. Yan, M. Schwaederle, D. Arguello // Cancer Metastasis Rev. – 2015. – Vol. 34. – P. 157–164.
167. Yang, E. Y. Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics / E. Y. Yang, K. Shah // Front Oncol. -2020. – Vol. 23, № 10. – P. 1182.
168. Zhang, H. HER2-Low Breast Cancers / H. Zhang, H. Katerji, B. M. Turner // Am. J. Clin. Pathol. – 2022. – Vol. 157. – P. 328–336.
169. Zhang, H. Intratumoral and intertumoral heterogeneity of HER2 immunohistochemical expression in gastric cancer / H. Zhang, Y. Wang, D. Wu [et al.] // Pathol Res Pract. – 2020. – Vol. 216, № 11. – P. 153229.