

УДК 576.3.086.8:544.582.3

DOI 10.20538/1682-0363-2017-3-25–33

Для цитирования: Брагина О.Д., Ларькина М.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Юсубов М.С., Скуридин В.С., Деев С.М., Зельчан Р.В., Булдаков М.А., Подрезова Е.В., Белоусов М.В. Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченых  $^{99m}\text{Tc}$  рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (3): 25–33

## Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченых $^{99m}\text{Tc}$ рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu

Брагина О.Д.<sup>1</sup>, Ларькина М.С.<sup>3</sup>, Стасюк Е.С.<sup>2</sup>, Чернов В.И.<sup>1,2</sup>, Юсубов М.С.<sup>2,3</sup>, Скуридин В.С.<sup>2</sup>, Деев С.М.<sup>2,5</sup>, Зельчан Р.В.<sup>1</sup>, Булдаков М.А.<sup>1,4</sup>, Подрезова Е.В.<sup>2</sup>, Белоусов М.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра (НИМЦ) Российской академии наук (РАН)  
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

<sup>3</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>4</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)  
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

<sup>5</sup> Институт биоорганической химии (ИБХ) им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

### РЕЗЮМЕ

В настоящее время актуальным является поиск новых диагностических методов, позволяющих с высокой информативностью и достоверностью выявлять злокачественные образования с гиперэкспрессией Her-2/neu. В последние годы активно развиваются радиоизотопные методы для выявления специфических опухолевых мишеней, при этом в качестве «нацеливающего» модуля выступают антитела.

**Цель исследования.** Создание химически стабильного радиохимического соединения для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu.

**Материал и методы.** Исследование проводилось с использованием двух клеточных линий аденокарцином человека с экспрессией (BT-474) и без экспрессии (MCF-7) Her-2/neu. Характеристика специфичности связывания исследуемого комплекса с рецептором Her-2/neu определялась с помощью прямой радиометрии и планарной сцинтиграфии. Для оценки отличий количественных признаков между группами применялся непараметрический тест Манна – Уитни.

**Результаты.** Выход меченого комплекса составил более 91%, при радиохимической частоте – более 94%. При проведении визуальной сцинтиграфической оценки значительно большая интенсивность накопления изучаемого радиохимического соединения отмечалась в культуре клеток с гиперэкспрессией поверхностного рецептора Her-2/neu. Результаты прямой радиометрии также продемонстрировали более высокое накопление радиофармацевтического препарата в клеточной линии аденокарциномы

✉ Брагина Ольга Дмитриевна, e-mail: rungis@mail.ru.

молочной железы человека BT-474 с гиперэкспрессией Her-2/neu по сравнению с контрольной группой.

**Заключение.** При проведении доклинических испытаний *in vitro* показана высокая стабильность исследуемого соединения, а также его аккумуляция в группе клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu.

**Ключевые слова:** DARPIn, технеций-99м, хелатирующий агент, Her-2/neu, молекулярная визуализация, рак молочной железы.

## ВВЕДЕНИЕ

На протяжении двух последних десятилетий особый интерес вызывает изучение поверхностного рецептора Her-2/neu, относящегося к семейству трансмембранных тирозинкиназных рецепторов (EGFR = ErbB1/HER1; ErbB2/HER2; ErbB3/HER3; ErbB4/HER4) и в норме экспрессирующегося на поверхности всех эпителиальных клеток организма [1]. При злокачественной трансформации происходит амплификация гена *Her-2/neu*, приводящая к гиперэкспрессии кодируемого им рецептора и усиленному формированию гомо- и гетеродимеров, что обуславливает неконтролируемую передачу сигнала и нарушение процессов апоптоза, пролиферации и клеточного деления [2, 3].

Наличие гиперэкспрессии Her-2/neu выявляется на поверхности опухолевых клеток при раке легкого, яичников, желудка, простаты и пр. [4]. Особое место среди злокачественных новообразований занимает рак молочной железы, при котором амплификация гена *Her-2/neu* отмечается у 15–20% больных и ассоциируется с агрессивным течением заболевания, а также с низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости [5]. Все это позволяет успешно использовать Her-2/neu в качестве мишени не только для диагностики, но также и для проведения направленной (таргетной) терапии у пациентов с гиперэкспрессией данного параметра [6]. Наиболее ярким примером является использование таргетного препарата трастузумаб (герцептин), который до сих пор остается золотым стандартом терапии больных Her-2/neu-позитивным раком молочной железы, значительно увеличивающим показатели общей и безрецидивной выживаемости [7]. При этом на первом этапе определяется наличие и (или) отсутствие гиперэкспрессии этого рецептора на поверхности опухолевой клетки, а на втором (при наличии экспрессии соответственно) проводится лечение [8].

В настоящее время существует ряд диагностических методик, позволяющих выявить наличие гиперэкспрессии рецептора Her-2/neu

[9]. Наибольшее распространение получил иммуногистохимический метод, что обусловлено возможностью повседневной оценки экспрессии с использованием срезов парафиновых блоков ткани, фиксированной формалином [10]. Однако, несмотря на доступность и относительную дешевизну, он имеет ряд недостатков, к которым относят необходимость инвазивной процедуры (взятие биопсийного или операционного материала), высокую частоту ложноположительных и ложноотрицательных результатов, а также возможное нарушение методологии выполнения исследования и неправильную интерпретацию полученных результатов [11]. Более надежным способом выявления гиперэкспрессии Her-2/neu является флуоресцентная гибридизация *in situ* [12]. Однако, несмотря на высокую информативность, данная методика также имеет свои недостатки: невозможность выполнения исследования *in vivo* с оценкой распространенности опухолевого процесса (оценка основного опухолевого узла, регионарных лимфатических узлов, отдаленных органов и тканей). Неоднозначными также остаются случаи, связанные с опухолевой гетерогенностью экспрессии HER2, что является серьезной диагностической проблемой в определении точного рецепторного статуса злокачественного образования, и, соответственно, разрозненностью полученных результатов исследования [13, 14]. В связи с этим в настоящее время по-прежнему остается актуальным поиск новых диагностических методов, позволяющих с высокой информативностью и достоверностью выявлять злокачественные образования с гиперэкспрессией Her-2/neu [15].

В последние годы активно развиваются радиоизотопные методы для выявления специфических опухолевых мишеней с применением радиоизотопов [16]. При этом в качестве «нацеливающего» на молекулярные мишени модуля выступают антитела [17]. Представляет интерес новый класс адресных молекул неиммуноглобулиновой природы Design Ankyrin Repeat Protein (DARPIn), которые являются пригодными для соединения с радиоактивными изотопами [18]. Главными

преимуществами таких белковых структур являются небольшой размер (14–20 кДа), стабильная структура, высокая специфичность и аффинность к антигену, а также значительно более низкая стоимость производства, обусловленная их экспрессией в бактериальных средах [19, 20].

Наиболее часто используемым радионуклидом для радиодиагностических препаратов выступают технеций-99м ( $^{99m}\text{Tc}$ ), главными достоинствами которого является его доступность, короткий период полураспада ( $T_{1/2} = 6,05$  ч), невысокая стоимость изготовления и эксплуатации генераторов  $^{99m}\text{Tc}$ , а также простая технология получения элюата из генератора  $^{99m}\text{Tc}$  [21, 22].

Важным в радиохимическом синтезе является выбор хелатирующего агента для связывания  $^{99m}\text{Tc}$ , а также разработка методики химической модификации рекомбинантных адресных молекул с сохранением их способности связываться со специфическими рецепторами опухолевых клеток [23, 24].

Целью настоящего исследования являлось создание химически стабильного радиохимического соединения для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu. При этом в качестве «нацеливающего» модуля использовался анти-Her-2/neu белок DARPIn9\_29, а в качестве визуализирующего – радиоизотоп  $^{99m}\text{Tc}$ . В качестве хелатирующего агента применялся сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноат (DPAH-NHS ester) [25].

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Кодирующая последовательность DARPIn9\_29 была амплифицирована с плазмиды pCG-Hnse-DARPIn-d18-9-29 с использованием специфических праймеров 5'-cgccgaattcttgcaggtttcagccag (предоставлена проф. Деевым С.М., ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Технеций-99м для исследований был получен из генератора технеция « $^{99m}\text{Tc}$ -ГТ-ТОМ» [21]. Пертехнетат-ионы, присутствующие в исходном элюате из генератора, имеют высшую степень окисления (VII), при которой они не обладают высокой химической активностью и не проявляют склонности к комплексообразованию. Для понижения их степени окисления используются различные восстановители, но чаще всего применяют хлорид двухвалентного олова [26]. В данной работе в качестве восстановителя также использовался хлорид двухвалентного олова ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). В качестве хелатирующего агента применялся сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноат (DPAH-NHS ester).

Для исследования и синтеза хелатирующего агента применялись субстраты, реагенты и органические растворители, являющиеся товарными продуктами фирм Aldrich (США), Fluka (Швейцария) и других, соответствующей чистоты, которые использовались без предварительной очистки.

Синтез DPAH-NHS ester проводили по разработанной методике на кафедре технологии органических веществ и полимерных материалов НИ ТПУ. В качестве основного субстрата использовали циклогексанон, промежуточного субстрата – метиловый эфир 6-иодгексановой кислоты [27].

Для получения радиофармацевтического препарата (РФП) во флакон вместимостью 10 см<sup>3</sup> с набором реагентов (100 мкл раствора DPAH-DARPIn9\_29 концентрацией 0,5 мг/мл (в фосфатном буфере), 60 мкл раствора цитрата натрия с концентрацией 100 мг/мл и 20–60 мкл раствора  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  с концентрацией 7 мг/мл) через пробку вводят 1 мл элюата  $^{99m}\text{Tc}$  с активностью 0,5–3,7 ГБк (не вставляя воздушную иглу). После перемешивания и инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре препарат готов к применению.

Определения радиохимического выхода и радиохимической чистоты (РХЧ) полученного РФП проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах силикагеля (Sorbfil, Россия). В качестве подвижных фаз применяли две системы: ацетон (система 1) и смесь –  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (96%) :  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) :  $\text{H}_2\text{O}$  в соотношении 2 : 5 : 5 (система 2) соответственно. В ацетоне комплекс  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-DARPIn9\_29 остается на линии старта, а пертехнетат-ионы  $^{99m}\text{Tc}$ (VII) поднимаются с фронтом растворителя. В систему 2 комплекс  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-DARPIn9\_29 и свободные пертехнетат-ионы поднимаются с фронтом элюента, а гидролизованный технеций остается на линии старта. Распределение активности  $^{99m}\text{Tc}$  на радиохроматограммах изучали с помощью установки «ГаммаСкан-01А» («Амплитуда», Россия).

В качестве исследуемой группы использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека BT-474 с гиперэкспрессией Her-2/neu, контрольной – клетки человеческой аденокарциномы молочной железы MCF-7. Обе клеточные линии культивировали в питательной среде DMEM («Панэко», Россия) с добавлением 10%-й инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) и пенициллина-стрептомицина («Панэко», Россия) при 37 °С и 5%-м уровне  $\text{CO}_2$ . Клеточную суспензию пересевали в новые чашки Петри (ТТР, Швейцария) каждые

3–4 дня при достижении 70–80% монослоя. Клетки снимали раствором трипсин-ЭДТА («Панэко», Россия). Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева.

Характеристику специфичности связывания комплекса с рецептором Her-2/неu определяли с помощью прямой радиометрии и планарной сцинтиграфии в пяти экспериментальных исследованиях. Для изучения особенностей накопления исследуемого комплекса клетки аденокарциномы молочной железы человека BT-474 и MCF-7 в количестве 35 000 клеток/мл среды рассеивали в 96-луночный планшет в объеме 200 мкл суспензии на лунку и культивировали в течение ночи, затем среда удалялась, а клетки промывались натрий-фосфатным буфером (PBS). Далее каждую клеточную культуру объемом по 1 мл (3 млн клеток/мл) распределяли по пяти пробиркам и в каждую добавляли по 70 МБк (100 мкл) исследуемого РФП с последующей инкубацией в течение 40 мин при температуре 4 °С. После завершения инкубации пробирки с исследуемыми субстанциями центрифугировали в течение 5 мин при скорости 1000 g, затем удаляли надосадочную жидкость и измеряли радиоактивность осадка. Измерение производилось с использованием гамма-счетчика для исследований *in vitro* («Амплитуда», Россия).

После трехкратной отмывки выполнялась визуальная сцинтиграфическая оценка интенсивности включения РФП в исследуемые группы клеток с использованием гамма-камеры (мультидетекторная гамма-камера E.CAM180 (Siemens, Германия) с последующей обработкой получен-

ных данных с применением пакета специализированных программ Esoft 5.5 (Siemens, Германия).

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета программ Statistica for Windows. Для оценки отличий количественных признаков между группами применялся непараметрический тест Манна – Уитни. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости  $p$  принимали равным 0,05. Результаты представлены как  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $SD$  – стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты связывания молекулы DPAH–DARPin9\_29 с технецием-99м в зависимости от количества вводимого восстановителя. Наибольший радиохимический выход при низком содержании примесей невосстановленного и гидролизованного технеция-99м наблюдался при добавлении к смеси состава 100 мкл раствора DPAH–DARPin9\_29, 60 мкл раствора цитрата натрия и 50 мкл раствора хлорида олова, он составил более 91%. При добавлении большего количества хлорида олова радиохимический выход снижался из-за увеличения количества образовавшегося коллоида гидролизованного технеция-99м. Дальнейшие исследования *in vitro* выполнялись с соединением, имеющим следующий состав: 100 мкл раствора DPAH–DARPin9\_29 с концентрацией 0,5 мг/мл (в фосфатном буфере), 60 мкл раствора цитрата натрия с концентрацией 100 мг/мл, 50 мкл раствора SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O с концентрацией 7 мг/мл и <sup>99m</sup>Tc с активностью 0,5–3,7 ГБк.

Т а б л и ц а 1

Эффективность связывания молекулы DPAH–DARPin9_29 с технецием-99м в зависимости от количества восстановителя, %			
Состав радиофармпрепарата	Выход	Невосстановленный <sup>99m</sup> Tc (VII)	Гидролизированный <sup>99m</sup> Tc
100 мкл DPAH–DARPin9_29 + 20 мкл раствора SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 60 мкл раствора цитрата натрия	79,0	15,8	0,9
100 мкл DPAH–DARPin9_29 + 30 мкл раствора SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 60 мкл раствора цитрата натрия	83,0	10,8	1,2
100 мкл DPAH–DARPin9_29 + 40 мкл раствора SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 60 мкл раствора цитрата натрия	89,7	8,6	2,4
100 мкл DPAH–DARPin9_29 + 50 мкл раствора SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 60 мкл раствора цитрата натрия	91,3	2,0	3,0
100 мкл DPAH–DARPin9_29 + 60 мкл раствора SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O + 60 мкл раствора цитрата натрия	89,3	0,9	8,9

Основной механизм действия специфических РФП на основе рекомбинантных адресных молекул DARPIn9\_29 заключается в их взаимодействии с рецепторами на поверхности опухолевых клеток, что позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять злокачественные новообразования различных локализаций с гиперэкспрессией Her-2/neu. Для изучения специфичности накопления изучаемого препарата на основе рекомбинантных адресных молекул  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-DARPIn9\_29 была выбрана клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека BT-474, которая характеризуется гиперэкспрессией рецептора Her-2/neu. Доказательством селективного взаимодействия с препаратом является высокая аккумуляция препарата на поверхности исследуемой группы клеток.

При проведении визуальной сцинтиграфической оценки значительно большая интенсивность накопления изучаемого РФП отмечалась в культуре клеток с гиперэкспрессией поверхностного рецептора Her-2/neu (рисунок).

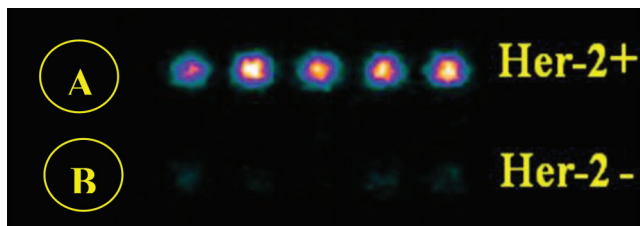


Рисунок. Визуальная сцинтиграфическая оценка накопления радиофармпрепарата  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-DARPIn9\_29: А – клетки тканей злокачественных опухолей с гиперэкспрессией Her-2/neu (BT-474, Her-2/neu – позитивная, человеческая аденокарцинома молочной железы); В – клетки тканей злокачественных опухолей без гиперэкспрессии Her-2/neu (MCF-7, Her-2/neu – отрицательная, человеческая аденокарцинома молочной железы)

Fig. Visual scintigraphic evaluation of the accumulation of radiopharmaceutical  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-DARPIn9\_29: А – tissue cells of malignant tumors with Her-2/neu overexpression (BT-474, Her-2/neu-positive, human mammary gland adenocarcinoma); В – tissue cells of malignant tumors without overexpression of Her-2/neu (MCF-7, Her-2/neu – negative, human mammary gland adenocarcinoma)

Т а б л и ц а 2

Накопление радиофармацевтического препарата $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-DARPIn9_29 в клеточных линиях BT-474 и MCF-7, $M \pm SD$			
№ эксперимента	MCF-7 (МБк)	BT-474 (МБк)	$p$
1	$0,098 \pm 0,014$	$0,306 \pm 0,038$	0,043
2	$0,072 \pm 0,021$	$0,4 \pm 10,025$	0,038
3	$0,087 \pm 0,019$	$0,29 \pm 0,042$	0,019
4	$0,069 \pm 0,022$	$0,31 \pm 0,039$	0,025
5	$0,091 \pm 0,015$	$0,40 \pm 20,051$	0,003

При проведении прямой радиометрии также продемонстрировано более высокое накопление РФП в клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека BT-474 с гиперэкспрессией Her-2/neu по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе изучено новое специфичное соединение на основе рекомбинантных адресных молекул  $^{99m}\text{Tc}$ -DPAH-DARPIn9\_29, описана процедура его получения, охарактеризованы его специфичность и аффинность к рецептору Her-2/neu. Высокая специфичность и стабильность данного препарата делают его перспективным агентом для диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией Her-2/neu.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Брагина О.Д. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи, окончательное утверждение версии, которая сдается в печать. Ларькина М.С. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи. Стасюк Е.С. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи. Чернов В.И. – обоснование рукописи, разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи. Юсубов М.С. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи. Скуридин В.С. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи. Деев С.М. – разработка концепции и дизайна исследования, Зельчан Р.В. – подготовка текста статьи. Булдаков М.А. – подготовка текста статьи. Подрезова Е.В. – интерпретация данных. Белоусов М.В. – интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

- Полянский О.А., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. ERBB онкогены – мишени моноклональных антител // *Биохимия*. 2012; 3 (77): 289–311.
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радиоиммунотерапия: современное состояние проблемы // *Вопросы онкологии*. 2016; 62 (1): 24–30.
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радиоиммунотерапия в лечении злокачественных образований // *Сибирский онкологический журнал*. 2016; 15 (2): 101–106.
- Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogenes // *Science*. 1987; 235: 177–182. doi: 10.1126/science.3798106.
- Romond E.H., Perez E.A., Bryant J. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer // *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 1673–1684. doi: 10.1056/NEJMoa052122.
- Verma S., Miles D., Gianni L. et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer // *N. Engl. J. Med.* 2012; 367: 1783–1791. doi: 10.1056/NEJMoa1209124.
- Babyskhina N., Malinovskaya E., Cherdinceva N. et al. Neoadjuvant chemotherapy for different molecular breast cancer subtypes: a retrospective study in Russian population // *Medical Oncology*. 2014; 31 (9): 1–12.
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радионуклидная тераностика злокачественных образований // *Вестник рентгенологии и радиологии*. 2016; 97 (5): 306–313.
- Zahid M., Khan S., Khan R. et al. Detection of HER2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization technique // *Pathology*. 2016; 48 (1): 163–170.
- Orlando L., Viale G., Bria E. et al. Discordance in pathology report after central pathology review: Implications for breast cancer adjuvant treatment // *Breast*. 2016; 30: 151–155. doi: 10.1016/j.breast.2016.09.015.
- Telugu R.B., Chowhan A.K., Rukmangadha N. et al. Human epidermal growth factor receptor 2/neu protein expression in meningiomas: An immunohistochemical study // *J. Neurosci Rural Pract.* 2016; 7 (4): 526–531. doi: 10.4103/0976-3147.188640.
- Hanna W.M., Rüschoff J., Bilous M. et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity // *Mod. Pathol.* 2013; 27: 4–18. doi: 10.1038/modpathol.2013.103.
- Kurozumi S., Padilla M., Kurozumi M. et al. HER2 intratumoral heterogeneity analyses by concurrent HER2 gene and protein assessment for the prognosis of HER2 negative invasive breast cancer patients // *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 158: 99–111. doi: 10.1007/s10549-016-3856-2.
- Seol H., Lee H.J., Choi Y. et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance // *Modern Pathology*. 2012; 25: 938–948. doi: 10.1038/modpathol.2012.36.
- Riccardona G., Decristoforo C. Peptide targeted imaging of cancer // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2003; 18: 675–687. doi:10.1089/108497803770418238.
- Engfeldt T., Orlova A., Tran T. et al. Imaging of HER2-expressing tumours using a synthetic Affibody molecule containing the 99mTc-chelating mercaptoacetyl-glycyl-glycyl-glycyl (MAG3) sequence // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2007; 34 (5): 722–733. doi: 10.1007/s00259-006-0266-4.
- Stumpp M. T., Binz H.K., Amstutz P. DARPins: A new generation of protein therapeutics // *Drug Discovery Today*. 2008; 13 (15): 695–701.
- Tamaskovic R., Simon M., Stefan N. et al. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) from research to therapy // *Methods Enzymol.* 2012; 503: 101–134. doi: 10.1016/j.drudis.2008.04.013.
- Boersma Y.L., Pluckthun A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011; 22: 849–57. doi: 10.1016/j.copbio.2011.06.004.
- Binz H.K., Stumpp M.T., Forrer P., Amstutz P., Pluckthun A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins // *J. Mol. Biol.* 2003; 332: 489–503.
- Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Sadkin V.L., Rogov A.S. Adsorption of 99mTc on Aluminum Oxide // *Radiochemistry*. 2011; 5 (53): 448–451.
- Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Skuridin V.S. et al. A procedure for sorbent pretreatment for the production of high-activity 99Mo/99mTc generators based on enriched 98Mo // *Radiochemistry*. 2012; 54 (4): 391–394.
- Gabriel M., Decristoforo C., Donnemiller E. et al. An inpatient comparison of 99mTc-EDDA/HYNICTOC with 111In-DTPA-octreotide for diagnosis of somatostatin receptorexpressing tumors // *J. Nucl. Med.* 2003; 44: 708–716.
- Yusubov M.S., Svitich D.Y., Larkina M.S. et al. Applications of iodonium salts and iodonium ylides as precursors for nucleophilic fluorination in Positron Emission Tomography // *ARKIVOC*. 2013; (i): 364–395.
- Kulibaba E.V., Larkina M.S. New syntheses of bis(2-pyridylmethyl)amino acid // *IX international conference of young scientists on chemistry «Mendeleev 2015»*. Book of abstracts. Saint Petersburg, 7–10 of April 2015; 250.
- Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Rogov A.S. et al. Modified DTPA molecule-based nanocolloid radiopharma-

ceuticals // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2015; 303 (3): 1961–1965.

27. Юсубов М.С., Жданкин В.В., Ларькина М.С., Дрыгу-

нова Л.А. Способ получения ω-иодалифатических карбоновых кислот и их эфиров. Патент № 2494087. 2013; Опубл. 27.09.2013. Бюл. № 27.

Поступила в редакцию 22.12.2016

Утверждена к печати 30.06.2017

**Брагина Ольга Дмитриевна**, канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск.

**Ларькина Мария Сергеевна**, канд. фарм. наук, доцент, кафедра фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

**Стасюк Елена Сергеевна**, канд. техн. наук, науч. сотрудник, лаборатория № 31, НИ ТПУ, г. Томск.

**Чернов Владимир Иванович**, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе и инновационной деятельности, зав. отделением радионуклидной диагностики, НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск.

**Юсубов Мехман Сулейман-оглы**, д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой технологии органических веществ и полимерных материалов, НИ ТПУ, г. Томск.

**Скуридин Виктор Сергеевич**, д-р техн. наук, профессор, зав. лабораторией № 31, НИ ТПУ, г. Томск.

**Деев Сергей Михайлович**, канд. хим. наук, д-р биол. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва; эксперт лаборатории № 31, НИ ТПУ, г. Томск.

**Зельчан Роман Владимирович**, канд. мед. наук, врач-радиолог, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск.

**Булдаков Михаил Александрович**, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория иммунологии, НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН; ст. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТПУ, г. Томск.

**Подрезова Екатерина Владимировна**, инженер, кафедра технологии органических веществ и полимерных материалов, НИ ТПУ, г. Томск.

**Белоусов Михаил Валерьевич**, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Брагина Ольга Дмитриевна, e-mail: rungis@mail.ru.

УДК 576.3.086.8:544.582.3

DOI 10.20538/1682-0363-2017-3-25–33

For citation: Bragina O.D., Larkina M.S., Stasyuk E.S., Chernov V.I., Yusubov M.S., Skuridin V.S., Deyev S.M., Zelchan R.V., Buldakov M.A., Podrezova E.V., Belousov M.V. Development of highly specific radiochemical compounds based on <sup>99m</sup>Tc-labeled recombinant molecules for targeted imaging of cells overexpressing Her-2/neu. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (3): 25–33

## The development of a highly specific radiochemical compound based on labeled <sup>99m</sup>Tc recombinant molecules for targeted imaging of cells with the overexpression of Her-2 / neu

**Bragina O.D.<sup>1</sup>, Larkina M.S.<sup>3</sup>, Stasyuk E.S.<sup>2</sup>, Chernov V.I.<sup>1,2</sup>, Yusubov M.S.<sup>2,3</sup>, Skuridin V.S.<sup>2</sup>, Deyev S.M.<sup>5</sup>, Zelchan R.V.<sup>1</sup>, Buldakov M.A.<sup>1,4</sup>, Podrezova E.V.<sup>2</sup>, Belousov M.V.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Science (RAS) 5, Kooperativnii Str., Tomsk, 634009, Russian Federation*

<sup>2</sup> *National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU) 30, Lenina Str., Tomsk, 634050, Russian Federation*

<sup>3</sup> *Siberian State Medical University 2, Moskov Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation*

<sup>4</sup> *National Research Tomsk State University (NR TSU) 36, Lenina Str., Tomsk, 634050, Russian Federation*

<sup>5</sup> *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences 16/10, Miklukbo-Maklaya Str., Moscow, 117997, Russian Federation*

**ABSTRACT**

Currently, there is a urgent need to search for new diagnostic methods that allow us to reveal malignant tumors with the overexpression of Her-2/neu with high accuracy. In recent years radioisotope methods have been actively developing to identify specific tumor targets, with antibodies being the “targeting” module.

**The purpose of the study.** Creation of a chemically stable radiochemical compound for the imaging of cells with the overexpression of Her-2/neu.

**Materials and methods.** The study was conducted using two human adenocarcinoma cell lines with expression (BT-474) and without expression (MCF-7) Her-2/neu. The specificity of the binding of the test complex with Her-2/neu receptor was determined by direct radiometric and planar scintigraphy. To evaluate the differences in quantitative characteristics between the groups a non-parametric Mann – Whitney test was used.

**Results.** The yield of the labeled complex was more than 91% and the radiochemical frequency was more than 94%. When performing a visual scintigraphic evaluation, a much higher accumulation rate of the studied radiopharmaceutical preparation (RFP) was observed in the culture of cells with overexpression of the surface Her-2/neu receptor. Direct radiometric results also demonstrated a higher accumulation of RFPs in the human BT-474 mammary adenocarcinoma cell line with Her-2/neu overexpression in comparison with the control group.

**Conclusion.** Preclinical studies demonstrated high stability of the test compound, as well as its accumulation in the group of cells with Her-2/neu overexpression.

**Key words:** DARPIn, technetium-99m, chelating agent, Her-2/neu, molecular imaging, breast cancer.

**REFERENCES**

- Polanovski O. L., Lebedenko E. N., Deyev S. M. ERBB oncogeni – misheni monoclonalnikh antitel [ERBB – oncogenes as targets for monoclonal antibodies] // *Biokhimiya – Biochemistry*. 2012; 3 (77): 289–311 (in Russian).
- Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G., et al. Radioimmunoterapiya: sovremennoe sostoyanie problemi [Radioimmunotherapy: current state of the problem] // *Voprosi Oncologii – Questions of Oncology*. 2016; 62 (1): 24–30 (in Russian).
- Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G. et al. Radioimmunoterapiya v lechenii zlokachestvennix obrazovaniy [Radioimmunotherapy in the treatment of malignancies] // *Sibirskii Oncologicheskii Jurnal – Siber. J. Oncol*. 2016; 15 (2): 101–106 (in Russian).
- Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G. et al. Human breast cancer: correlation of relapse an survival with amplification of the Her-2/neu oncogenes // *Science*. 1987; 235: 177–182. doi: 10.1126/science.3798106.
- Romond E.H., Perez E.A., Bryant J. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer // *N. Engl. J. Med*. 2005; 353: 1673–1684. doi: 10.1056/NEJMoa052122.
- Verma S., Miles D., Gianni L. et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer // *N. Engl. J. Med*. 2012; 367: 1783–1791. doi: 10.1056/NEJMoa1209124.
- Babyshkina N., Malinovskaya E., Cherdinceva N. et al. Neoadjuvant chemotherapy for different molecular breast cancer subtypes: a retrospective study in Russian population // *Medical Oncology*. 2014; 31 (9): 1–12.
- Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G. et al. Radionuclidnaya teranostica zlokachestvennix obrazovaniy [Radionuclide teranostic of malignancies] // *Vestnik Rentgenologii i Radiologii – Vestnik Rentgenologii and Radiologii*. 2016; 97 (5): 306–313 (in Russian).
- Zahid M., Khan S., Khan R. et al. Detection of HER2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization technique // *Pathology*. 2016; 48 (1): 163–170.
- Orlando L., Viale G., Bria E. et al. Discordance in pathology report after central pathology review: Implications for breast cancer adjuvant treatment // *Breast*. 2016; 30: 151–155. doi: 10.1016/j.breast.2016.09.015.
- Telugu R.B., Chowhan A.K., Rukmangadha N. et al. Human epidermal growth factor receptor 2/neu protein expression in meningiomas: An immunohistochemical study // *J. Neurosci Rural Pract*. 2016; 7 (4): 526–531. doi: 10.4103/0976-3147.188640.
- Hanna W.M., Rüschoff J., Bilous M. et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity // *Mod. Pathol*. 2013; 27: 4–18. doi: 10.1038/modpathol.2013.103.
- Kurozumi S., Padilla M., Kurozumi M. et al. HER2 intratumoral heterogeneity analyses by concurrent HER2 gene and protein assessment for the prognosis of HER2 negative invasive breast cancer patients // *Breast Cancer Res Treat*. 2016; 158: 99–111. doi: 10.1007/s10549-016-3856-2.
- Seol H., Lee H.J., Choi Y. et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance // *Modern Pathology*. 2012; 25: 938–948. doi: 10.1038/modpathol.2012.36.



15. Riccarbona G., Decristoforo C. Peptide targeted imaging of cancer // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2003; 18: 675–687. doi:10.1089/108497803770418238.
16. Engfeldt T., Orlova A., Tran T. et al. Imaging of HER2-expressing tumours using a synthetic Affibody molecule containing the  $^{99m}\text{Tc}$ -chelating mercaptoacetyl-glycyl-glycyl-glycyl (MAG3) sequence // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2007; 34 (5). 722–733. doi: 10.1007/s00259-006-0266-4.
17. Stumpp M. T., Binz H.K., Amstutz P. DARPins: A new generation of protein therapeutics // *Drug Discovery Today.* 2008; 13 (15): 695–701.
18. Tamaskovic R., Simon M., Stefan N. et al. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) from research to therapy // *Methods Enzymol.* 2012; 503: 101–134. doi: 10.1016/j.drudis.2008.04.013.
19. Boersma Y.L., Pluckthun A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011; 22: 849–57. doi: 10.1016/j.copbio.2011.06.004.
20. Binz H.K., Stumpp M.T., Forrer P., Amstutz P., Pluckthun A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins // *J. Mol. Biol.* 2003; 332: 489–503.
21. Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Sadkin V.L., Rogov A.S. Adsorption of  $^{99m}\text{Tc}$  on Aluminum Oxide // *Radiochemistry.* 2011; 5 (53): 448–451.
22. Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Skuridin V.S. et al. A procedure for sorbent pretreatment for the production of high-activity  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  generators based on enriched  $^{98}\text{Mo}$  // *Radiochemistry.* 2012; 54 (4): 391–394.
23. Gabriel M., Decristoforo C., Donnemiller E. et al. An inpatient comparison of  $^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNICTOC with  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide for diagnosis of somatostatin receptor-expressing tumors // *J. Nucl. Med.* 2003; 44: 708–716.
24. Yusubov M.S., Svitich D.Y., Larkina M.S. et al. Applications of iodonium salts and iodonium ylides as precursors for nucleophilic fluorination in Positron Emission Tomography // *ARKIVOC.* 2013; (i): 364–395.
25. Kulibaba E.V., Larkina M.S. New syntheses of bis(2-pyridylmethyl)amino acid // *IX international conference of young scientists on chemistry «Mendeleev 2015»*. Book of abstracts. Saint Petersburg. 7–10 of April 2015; 250.
26. Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Rogov A.S. et al. Modified DTPA molecule-based nanocolloid radiopharmaceuticals // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* 2015; 303 (3): 1961–1965.
27. Yusubov M.S., Jdankin V.V., Larkina M.S. et al. Sposob polucheniya  $\omega$ -iodalifalicheskix karbonovix kislot I ikh efirov [Method of producing omega-iodo-aliphatic carboxylic acids and esters thereof]. Patent № 2494087. 2013; 27.09.2013 (in Russian).

Received December 22.2016

Accepted June 30.2017

**Bragina Olga D.**, PhD, Junior Researcher, Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Larkina Maria S.**, PhD, Associate Professor, Pharmaceutical Analysis Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

**Stasyuk Elena S.**, PhD, Researcher, Laboratory № 31, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

**Chernov Vladimir I.**, DM, Professor, Head of the Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Yusubov Mekhman S.**, DChSc, Professor, Head of the Technology of Organic Substances and Polymer Materials Department, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

**Skuridin Victor S.**, DTSc, Professor, Head of the Laboratory № 31, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

**Deyev Sergei M.**, DBSc, Professor, Head of Laboratory of Molecular Immunology, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow; Expert of the Laboratory № 31, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

**Zel'chan Roman V.**, PhD, Radiologist of Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Buldakov Michael A.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU; Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

**Podrezova Ekaterina V.**, Engineer, Technology of Organic Substances and Polymer Materials Department, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Bragina Olga D.**, e-mail: rungis@mail.ru.