

УДК 616-006.6:577.112.086.132:577.218  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-3-16-24>

## Оценка функциональной пригодности лиофилизата таргетных каркасных белков с анкириновыми повторами для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2/neu в злокачественных опухолях

Варвашеня Р.Н.<sup>1,2</sup>, Прач А.А.<sup>2</sup>, Плотников Е.В.<sup>2</sup>, Деев С.М.<sup>2,3</sup>, Белоусов М.В.<sup>1,2</sup>, Ларькина М.С.<sup>1,2</sup>, Чернов В.И.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Научно-образовательная лаборатория химико-фармацевтических исследований (НОЛХФИ), Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ) Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

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

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии (ИБХ) им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

### РЕЗЮМЕ

**Цель** – изучить *in vitro* и *in vivo* функциональную пригодность лиофилизата таргетных каркасных белков с анкириновыми повторами DARPin G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys, меченых <sup>99m</sup>Tc, для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2/neu в злокачественных опухолях.

**Материалы и методы.** Для наработки таргетного белка использовали модифицированную генетическую конструкцию с последовательностью, кодирующей белок DARPin G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys. Для получения экспериментального препарата использовали лиофилизат, содержащий DARPin G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys со вспомогательными веществами, и раствор натрия пертехнетата, <sup>99m</sup>Tc (500 МБк) при инкубации 60 °С, 30 мин. Анализ радиохимической чистоты (РХЧ) <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys проводили тонкослойной радиохроматографией. Для оценки специфичности *in vitro* использовали клеточные линии: SKOV-3 > BT-474 > DU-145. Константу диссоциации определяли с помощью анализа насыщения на SKOV-3 в диапазоне концентраций белка от 0,2 до 40 нМ. Для оценки таргетных свойств и биораспределения использовали мышей линии Nu/j, несущих ксенотрансплантаты SKOV-3 (HER2/neu позитивные) и ксенотрансплантаты Ramos (HER2/neu негативные).

**Результаты.** Получен радиокомплекс на основе <sup>99m</sup>Tc и лиофилизата таргетных белков DARPin G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys с РХЧ более 96%. Связывание <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys с клетками является специфичным с  $K_D$  3,9 ± 0,5 нМ и пропорционально уровню экспрессии HER2/neu в клетках. Поглощение <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys в ксенотрансплантатах SKOV-3 было значимо выше, чем в ксенотрансплантатах Ramos. <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys продемонстрировал быстрое выведение из крови, почечный клиренс, низкие уровни активности в слюнных железах и желудке. Уровень накопления активности в печени составил около 5–7 %ВД/г. Кроме того, <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys имел очень низкое поглощение в легких, мышцах, тонком кишечнике и костях.

✉ Варвашеня Руслан Николаевич, [mr.varvashenya@mail.ru](mailto:mr.varvashenya@mail.ru)

**Заключение.** Лиофилизат таргетных каркасных белков DARPIn G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys, меченый <sup>99m</sup>Tc, функционально пригоден для визуализации гиперэкспрессии HER2/neu в опухолях, поскольку специфически связывается с рецептором, стабилен *in vivo* и имеет благоприятное биораспределение в органах и тканях. Радиокомплекс <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys получен по простой процедуре с высокой радиохимической чистотой.

**Ключевые слова:** злокачественные опухоли, Her2/neu, радионуклидная диагностика, DARPIn G3, оксотехнеций, лиофилизат

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Работа выполнена за счет финансирования проекта НИ ТПУ (Приоритет 2030 – НИП/ИЗ-104-375/423-2023).

**Соответствие принципам этики.** Протокол исследования одобрен этическим комитетом СибГМУ (код протокола 7715, 20190826).

**Для цитирования:** Варвашеня Р.Н., Прач А.А., Плотников Е.В., Деев С.М., Белоусов М.В., Ларькина М.С., Чернов В.И. Оценка функциональной пригодности лиофилизата таргетных каркасных белков с анкириновыми повторами для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2/neu в злокачественных опухолях. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(3):16–24. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-3-16-24>.

## Assessing functional suitability of a lyophilized formulation containing designed ankyrin repeat proteins for radionuclide imaging of HER2/neu overexpression in malignant tumors

Varvashenya R.N.<sup>1,2</sup>, Prach A.A.<sup>2</sup>, Plotnikov E.V.<sup>2</sup>, Deev S.M.<sup>2,3</sup>, Belousov M.V.<sup>1,2</sup>, Larkina M.S.<sup>1,2</sup>, Chernov V.I.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Science and Education Laboratory for Chemical and Pharmaceutical Research, Siberian State Medical University 2, Moscow Trakt, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Tomsk Polytechnic University 30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>3</sup> Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences 16/10, Miklukho – Maklaya Str., Moscow, 117997, Russian Federation

<sup>4</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMС), Russian Academy of Science 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim.** To study *in vitro* and *in vivo* the functional suitability of <sup>99m</sup>Tc-labeled lyophilized formulation containing designed ankyrin repeat protein (DARPIn) G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys for radionuclide imaging of HER2/neu overexpression in malignant tumors.

**Materials and methods.** To create a targeted protein, a modified genetic construct with the sequence encoding DARPIn G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys was used. To generate the experimental probe, we used a lyophilized formulation containing DARPIn G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys with auxiliary substances and <sup>99m</sup>Tc sodium pertechnetate (500 MBq) incubated at 60 °C for 30 min. Radiochemical purity of <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys was analyzed by thin-layer radiochromatography. SKOV-3, BT-474, and DU-145 cell lines were used to test binding specificity *in vitro*. The dissociation constant was determined via a saturation binding assay on SKOV-3 cells with a range of protein concentrations from 0.2 to 40 nM. Nu/j mice bearing HER2-positive SKOV-3 xenografts and HER2-negative Ramos xenografts were used to evaluate the targeting properties and biodistribution.

**Results.** A radiocomplex based on <sup>99m</sup>Tc and a lyophilized formulation with DARPIn G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys was obtained with the radiochemical purity of more than 96%. Binding of <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys to the cells was specific (K<sub>D</sub> 3.9 ± 0.5 nM) and proportional to the level of HER2/neu expression in the cells. The uptake of <sup>99m</sup>Tc-G3-

(GGGS)<sub>3</sub>Cys in SKOV-3 xenografts was significantly higher than in Ramos xenografts. <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys demonstrated rapid blood and renal clearance and had low activity in the salivary glands and stomach. Liver uptake was about 5–7%ID/g. In addition, <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys exhibited very low uptakes in the lungs, muscles, small intestine, and bones.

**Conclusion.** The <sup>99m</sup>Tc-labeled lyophilized formulation with DARPIn G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys is functionally suitable for imaging HER2/neu overexpression in tumors, as it binds specifically to the receptor, is stable *in vivo*, and has favorable biodistribution in organs and tissues. The radiocomplex based on <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys was obtained by a simple method with high radiochemical purity.

**Keywords:** malignant tumors, Her2/neu, radionuclide diagnosis, DARPIn G3, oxotechnetium, lyophilized formulation

**Conflict of interest.** The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** The study was supported by the TPU project (Priority 2030 – NIP / IZ-104-375/423-2023).

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol code 7715, 20190826).

**For citation:** Varvashenya R.N., Prach A.A., Plotnikov E.V., Deev S.M., Belousov M.V., Larkina M.S., Chernov V.I. Assessing functional suitability of a lyophilized formulation containing designed ankyrin repeat proteins for radionuclide imaging of HER2/neu overexpression in malignant tumors. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(3):16–24. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-3-16-24>.

## ВВЕДЕНИЕ

Гиперэкспрессия трансмембранных тирозинкиназных рецепторов часто коррелирует с процессом возникновения злокачественных новообразований, которые в норме экспрессируются на поверхности всех эпителиальных клеток организма. Особый интерес представляет рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2/neu), который играет важную роль в качестве онкорептора при злокачественных опухолях [1] молочной железы, желудочно-кишечного тракта, яичников и других. Этот рецептор чрезмерно экспрессируется во многих случаях рака яичников, молочной железы, пищевода, желудочно-кишечного тракта, раке легких и других видов рака [2].

Рак молочной железы (РМЖ) характеризуется тяжелым течением заболевания, низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости, а также амплификацией гена *HER2/neu* в 15–20% случаев. Поэтому данный онкомаркер используется в качестве мишени для диагностики и таргетной терапии у пациентов с гиперэкспрессией рецептора HER2/neu [3].

Моноклональные антитела, конъюгаты антитело-цитотоксин и ингибиторы тирозинкиназы используют в качестве таргетных терапевтических лекарственных средств, которые зависят от специфического распознавания HER2/neu [4]. Первый этап заключается в установке наличия и (или) отсутствия гиперэкспрессии HER2/neu на поверхности опухоле-

вой клетки. Только после этого осуществляется лечение – второй этап. В качестве такого лекарственного средства используется трастузумаб (герцептин), который является золотым стандартом терапии больных HER-2/neu-позитивным РМЖ, существенно увеличивающим показатели общей и безрецидивной выживаемости [5]. Кроме того, терапевтические лекарственные средства, тропные к HER2/neu, также проходят клиническую оценку для лечения карциномы яичников [6], немелкоклеточного рака легкого [7] и карцинома эндометрия [8].

Для рутинного использования зарегистрированных препаратов и дальнейшего развития таких методов лечения необходимо точное определение уровня экспрессии HER2/neu в опухолях. Уровень экспрессии мишени напрямую связан с противоопухолевым эффектом, в случае низкой экспрессии пациенты будут подвергаться риску тяжелых побочных эффектов при использовании таргетных препаратов и цитотоксинов [9]. Главной проблемой применения терапевтических средств, тропных на HER2/neu, является изменчивость экспрессии рецептора в злокачественных опухолях [10].

Биопсия (иммуногистохимический метод и флуоресцентная гибридизация *in situ*) является рутинным методом определения экспрессии HER2/neu [11]. Однако биопсия осложняется при наличии множественных метастазов из-за инвазивности этой процедуры, практически невозможно оценить распространенность опухолевого процесса и обнаружить

изменения уровня экспрессии HER2/neu после неoadьювантной терапии [11]. Чтобы преодолеть недостатки инвазивной биопсии, была предложена радионуклидная молекулярная визуализация экспрессии HER2/neu *in vivo* [12].

На основе результатов доклинических [13] и некоторых клинических [12–14] исследований о различных типах агентов для молекулярной визуализации HER2/neu (антитела, каркасные белки, фрагменты антител, аптамеры, пептиды) можно заключить, что наиболее перспективными таргетными молекулами являются каркасные белки. Они обеспечивают более высокую контрастность изображений в короткие сроки (2–4 ч после инъекции) по сравнению с другими нацеливающими агентами [12].

Рекомбинантные белки с анкириновыми повторами (DARPin), представляющие собой сконструированные высокоаффинные стабильные белки небольшого размера (14–18 кДа), являются перспективными при разработке радиофармацевтических лекарственных средств для визуализации онкорепцепторов. DARPins с высоким сродством к HER2/neu были отобраны с использованием рибосомного дисплея и продемонстрировали очевидный потенциал для нацеливания на опухоль [15]. R. Goldstein и соавт. продемонстрировали возможность радионуклидной визуализации экспрессии HER2/neu в ксенотрансплантатах опухолей человека у мышей с использованием DARPins, меченных  $^{111}\text{In}$  и  $^{125}\text{I}$  [16]. В ходе дальнейших исследований установлено, что DARPin G3 является лучшим вариантом для разработки агентов для молекулярной визуализации [17].

Для визуализации в ядерной медицине чаще всего используется радионуклид  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (период полураспада 6 ч), обеспечивающий хорошее пространственное разрешение и низкую поглощенную дозу у пациентов. Технеций-99m производится из генераторов, содержащих  $^{99\text{Mo}}$  (период полураспада 65,9 ч), которые могут быть доставлены в отдаленные больницы и обеспечивать  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  до 2 нед [18]. Таким образом,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  является привлекательной меткой для радионуклидной визуализации на основе однофотонной эмиссионной компьютерной томографии.

В I фазе клинических исследований был изучен вариант DARPin G3, меченный трикарбонилмо одновалентного технеция [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc(CO) $_3$  посредством гистидин-содержащего тага ((HE) $_3$  – три(гистидилглутамат)) [13]. Клинические данные показали, что использование DARPin (HE) $_3$ -G3 для радионуклидной диагностики безопасно при воздействии на пациентов малых доз. Диагностическая визуализация с использованием DARPin (HE) $_3$ -G3, меченого  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , обеспечивала четкую визуализацию HER2-экспрес-

сирующего РМЖ железы через 4 ч после инъекции и надежно различала HER2-положительные и HER2-отрицательные опухоли.

К недостаткам этого экспериментального радиофармпрепарата для клинического использования относятся двухэтапная процедура мечения и необходимость сложной очистки от радиохимических примесей. Это побудило к дальнейшим исследованиям по оптимизации и совершенствованию радиоактивной метки DARPin G3 технецием-99m для более простой и быстрой одноэтапной процедуры. Предыдущие исследования с использованием вариантов DARPin G3 показали, что использование хелаторов на основе пептида, размещенного на С-конце, содержащего цистеин, для образования оксотехнециевого комплекса обеспечивает низкое поглощение в нормальных тканях и высокое поглощение активности опухолью [19]. Было также показано, что новые варианты DARPin G3, меченные комплексом оксотехнеция, обеспечивают похожий контраст изображения, как и клинически апробированный вариант DARPin (HE) $_3$ -G3 [19]. Один из улучшенных вариантов DARPin G3, содержащий хелатор Gly-Gly-Gly-Ser-Cys, соединенный через (Gly-Gly-Gly-Ser) $_2$ -линкер на С-конце и обозначенный как  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -G3-(GGGS) $_3$ Cys, был предложен для пилотных клинических исследований (NCT05923268).

Однако перед клиническими испытаниями необходимо изучение функциональной пригодности DARPin G3-(GGGS) $_3$ Cys в составе полной композиции в форме лиофилизата. На функциональную пригодность таргетной молекулы белковой природы влияют многие факторы, в частности выбор хелатирующего агента для связывания радионуклида  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , условия мечения, состав композиции (комбинация химических предшественников). Существенную роль на аффинность, таргетные свойства и биораспределение *in vivo* таких молекул оказывает вид лекарственной формы. Изменение состава лекарственной формы, переход белка из раствора в лиофильное состояние могут привести к снижению или полному отсутствию его функциональной пригодности для визуализации HER2/neu и требует оценки этих свойств в *in vitro* и *in vivo* экспериментах.

Следует отметить, что таргетные белки, содержащие аминокислоту цистеин, легко окисляются до неаффинных гомодимеров, что делает их очень чувствительными к технологическим режимам, которые используются в получении лиофилизатов, являющихся, несомненно, наиболее удобными и стабильными при хранении лекарственными формами для рутинного изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов в медицинской организации [18].

Целью настоящего исследования было исследовать *in vitro* и *in vivo* функциональную пригодность лиофилизата таргетных каркасных белков с анкириновыми повторами DARPin G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys, меченых <sup>99m</sup>Tc, для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2/neu в злокачественных опухолях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нуклеотидная последовательность гена *DARPin G3* была выведена из аминокислотной последовательности DARPin G3, депонированной в PDB (номер доступа PDB: 2JAB) с учетом использования кодонов в высокоэкспрессируемых генах *Escherichia coli* с помощью свободно распространяемой программы DNABuilder (<http://www.innovationsinmedicine.org/software/DNABuilder/>). Геном был собран методом полимеразной цепной реакции из химически синтезированных олигонуклеотидов длиной 50 п.н., имеющих частично комплементарные последовательности. Экспрессию, выделение и очистку DARPin G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys проводили согласно методике, описанной ранее [19].

Методика изготовления экспериментального препарата. Пертехнетат технеция-99m, [<sup>99m</sup>Tc]TcO<sub>4</sub>, был получен из коммерческого <sup>99m</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc генератора ГТ-4К (ФГУП «Институт физической химии им. Л.Я. Карпова», г. Обнинск, Россия). Образцы получали с применением реагентов Fluka, Acros Organics (Великобритания), Panreac, Sigma Aldrich (США) и других марки х.ч. Во флакон, содержащий лиофилизированную смесь 3,3 мг DARPin G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys, 0,66 мг D-маннозы, 0,33 мг ПЭГ-4000, 0,075 мг олова (II) хлорида дигидрата, 5 мг натрия глюконата, 0,1 мг тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и фосфатного буфера, добавляли 500 мкл раствора натрия пертехнетата, <sup>99m</sup>Tc с активностью 500 МБк и перемешивали. Содержимое флакона инкубировали при 60 °С в течение 30 мин. После содержимое флакона доводили до 10 мл стерильным раствором 0,9%-го натрия хлорида. После перемешивания раствор фильтровали с помощью стерилизующей насадки на шприц с диаметром пор 0,2 мкм в стерильный депирогенизированный флакон. Анализ радиохимической чистоты экспериментальных образцов <sup>99m</sup>Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys проводили методом хроматографии в тонком слое сорбента с использованием полосок стекловолна на силикагеле iTLC (Agilent Technologies Inc. Folsom, США) в элюирующей системе фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4). Измерение радиоактивности на полосках iTLC в СРМ проводили с помощью радио-iTLC-сканера miniGITA Single (Elysia Raytest, Германия). Для получения стерильного раствора для

экспериментов на лабораторных животных радиоактивность измеряли на радиометре (РИС 1А, Амплитуда, Россия), оснащенного ионизационной камерой.

Радиоактивность в образцах *in vitro* и *in vivo* измеряли с помощью автоматизированного гамма-спектрометра с детектором NaI(Tl) Wizard 2480 (Pelkin Elmer, США). Клеточные линии раковых клеток человека SKOV-3 (карцинома яичников человека), BT-474 (карцинома молочной железы человека), экспрессирующие рецепторы HER2/neu, а также клеточная линия DU-145 (аденокарцинома простаты человека) с низким уровнем экспрессии HER2/neu были приобретены в ООО «ПраймБиоМед» (г. Москва, Россия). Клетки культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), дополненной 10%-й фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM L-глутамина, 100 МЕ/мл пенициллина и стрептомицина 100 мкг/мл, в увлажненном инкубаторе с 5%-м CO<sub>2</sub> при 37 °С.

Для оценки специфичности *in vitro* за 24 ч до эксперимента клетки высевали в планшеты по 6 лунок, плотность составила  $7 \times 10^5$  клеток на лунку. Для одной клеточной линии использовали один планшет. В качестве контрольной группы использовали 100-кратный избыток немеченого белка DARPin G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys. К трем чашкам опытной группы добавляли такой же объем среды для культивирования клеток. Чашки инкубировали при 37 °С 30 мин для насыщения рецепторов HER2/neu. После этого раствор [<sup>99m</sup>Tc]Tc-G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys добавляли в каждую чашку до финальной концентрации 1 нМ и инкубировали при 37 °С 1 ч. После инкубации среду собирали, клетки промывали фосфатным буфером и объединяли растворы, затем клетки отделяли трипсином и собирали. Активность фракций измеряли с помощью гамма-спектрометра и рассчитывали процент связанной с клетками активности в пересчете на 1 млн клеток. Эксперимент проводился при трехкратном повторении.

Методика определения равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ) была описана ранее [19]. Эксперимент проводили на клеточной линии SKOV-3. Радиоактивность измеряли с помощью гамма-спектрометра. Параметры  $K_D$  и максимальное количество сайтов связывания на клетку ( $B_{max}$ ) рассчитывали методом нелинейной регрессии с использованием программы PRISM (Graphpad Software, США).

Для оценки таргетных свойств и биораспределения меченого <sup>99m</sup>Tc лиофилизата белка G3-(GGGS)<sub>3</sub>Cys использовали иммунодефицитных мышей линии Nu/j, несущих ксенотрансплантаты SKOV-3 с высокой экспрессией HER2/neu, и ксенотрансплантаты Ramos с отсутствием экспрессии HER2/neu. Сам-

кам мышей Nu/J подкожно имплантировали десять млн клеток SKOV-3 или такое же количество клеток Ramos. Эксперименты проводили через 3 нед после имплантации. Средняя масса животных на момент проведения эксперимента составляла ( $25,4 \pm 1,8$ ) г. Средняя масса опухоли составляла ( $0,4 \pm 0,2$ ) и ( $0,2 \pm 0,05$ ) г для ксенотрансплантатов SKOV-3 и Ramos соответственно. Мышам вводили 3 мкг  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  (40 кБк, 100 мкл в стерильном фосфатно-солевом растворе) в хвостовую вену. Кровь, органы и ткани, представляющие интерес, после эвтаназии животных, собирали и взвешивали, активность измеряли с помощью гамма-спектрометра. Расчет накопленной активности в органах рассчитывали как процент от введенной дозы на грамм образца (%ВД/г).

При планировании и проведении экспериментов над животными соблюдались все применимые международные и национальные руководящие принципы Российской Федерации по уходу и использованию животных. Протокол исследования на животных одобрен этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (код протокола 7715, 20190826).

Для определения значимых различий ( $p < 0,05$ ) использовали  $U$ -критерий Манна–Уитни. Статистический анализ проводили с помощью программы Prism (версия 9.0.0 для Windows; GraphPad Software, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состав лиофилизата белка  $\text{G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  для изготовления экспериментального образца был разработан как многокомпонентный, что обусловлено необходимостью применения двух групп вспомогательных веществ [19–21]. Первая группа направлена на защиту функциональности белка при технологии получения лиофилизата и сохранение его способности переходить в раствор при растворении лиофилизата. В качестве таких вспомогательных веществ использовали D-манозу и ПЭГ-4000. Вторая группа веществ необходима для радиоактивного мечения белка, в основе которого лежит процесс восстановления семивалентного  $^{99m}\text{Tc}$  в пертехнетате натрия до пятивалентного с последующим образованием комплекса оксотехнеция с хелатной группой (-GGSC) белка. В качестве таких веществ использовали восстановитель олова дихлорид, солиганд натрия глюконат и ЭДТА. После добавления раствора элюата пертехнетата с генератора к лиофилизату смесь инкубировали при нагревании согласно процедуре [19]. Радиохимическая чистота радиокомплекса  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  составила  $98 \pm 1$  %. Методика мечения раствора белка  $\text{G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$ , предложенная ранее [19], воспроизводится для лиофилизата с

получением радиокомплекса  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  высокой чистоты, не требующем очистки.

Для изучения специфичности к HER2/neu меченого  $^{99m}\text{Tc}$  лиофилизата протеина  $\text{G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  использовали клеточные линии с различным уровнем экспрессии рецептора: SKOV-3 > BT-474 > DU-145. Эксперимент проводили с блокированием рецепторов немеченым белком  $\text{G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$ . Изучение специфичности *in vitro* продемонстрировало высокий уровень специфического связывания с клетками и пропорционально уровню экспрессии HER2/neu в клетках. При этом блокирование рецепторов избытком немеченого белка отмечается значительное снижение связывания  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  во всех группах клеток ( $p < 0,0005$ ) (рис. 1).

Оценка аффинности методом насыщения показала, что  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  связывается с рецепторами HER2/neu на поверхности клеток SKOV-3 с наномолярным значением  $K_D$  ( $3,9 \pm 0,5$  нМ) (рис. 1), что характеризует меченый  $^{99m}\text{Tc}$  белок, полученный из лиофилизата, как высокоаффинный к целевым рецепторам.

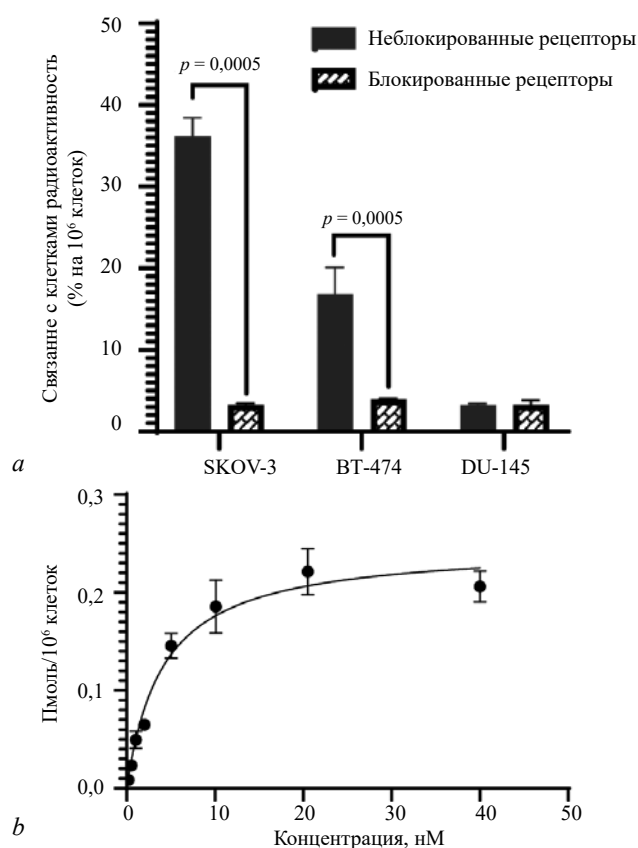


Рис. 1. Результаты *in vitro* оценки меченого  $^{99m}\text{Tc}$  лиофилизата белка  $\text{G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$ : а – определение специфичности связывания с HER2/neu; б – кривая насыщения на HER2/neu-экспрессирующих клетках SKOV-3. Результаты представлены в качестве средних значений % на  $10^6$  клеток  $\pm$  стандартное отклонение из трех образцов

Сравнение биораспределения и накопления  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  в ксенотрансплантатах SKOV-3 с высокой экспрессией HER2/neu и Ramos с отсутствием экспрессии HER2/neu представлены на рис. 2. Параллельное сравнение биораспределения  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  в ксенотрансплантатах SKOV-3 и Ramos показало, что характер биораспределения аналогичен ( $p > 0,05$ ), за исключением накопления в опухоли. Поглощение  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  в ксенотрансплантатах SKOV-3 было значительно ( $p < 0,005$ ) выше, чем в ксенотрансплантатах Ramos. Это показывает, что уровень накопления коррелирует с экспрессией HER2/neu.

$^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  продемонстрировал быстрое выведение из крови и преимущественно почечный клиренс, при этом наблюдалось невысокое сохранение активности в почках 12–20 %ВД/г. Это может быть обусловлено быстрой интернализацией белка после реабсорбции в почках и высвобождения из клетки радиокатаболитов, содержащих остатки аминокислоты глицина в хелатной группе [17].

Низкие уровни накопления активности отмечаются также в слюнных железах и желудке, что свидетельствует о стабильности радиокомплекса *in vivo*, поскольку не наблюдался гидролиз комплекса с выделением свободного  $^{99m}\text{Tc}$ , способного накапливаться в этих органах. Кроме того, вариант  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  имел очень низкое поглощение в легких, мышцах, тонком кишечнике и костях, что является благоприятным для визуализации метастаз в этих областях [22].

Уровень накопления активности в печени составил около 5–7 %ВД/г при соотношении опухоль/печень менее одного (около 0,7 раза), что является нежелательным для визуализации метастаз в печени. Однако биораспределение у мышей не полностью совпадает с биораспределением у человека, и можно ожидать, что в клинических исследованиях уровень накопления в печени не будет препятствовать визуализации метастаз в печени [23]. Судя по всему, выделение радиометаболитов через желчь играло незначительную роль, так как активность в желудочно-кишечном тракте с его содержимым была низкой (около 2%).

Можно предположить, что механизм удержания активности в печени не полностью обусловлен гепатобилиарной экскрецией, а возможно, это лиганд-рецепторное взаимодействие или иные механизмы. Экспрессия HER2/neu в печени присутствует и может обуславливать накопление активности рецептор-зависимого белка  $\text{G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  в этом органе. Подбор оптимальной дозы белка в клинических исследованиях радиомеченых каркасных белков позволяет контролировать этот процесс и получать

желаемый контраст для визуализации метастазов в печени [14, 24].

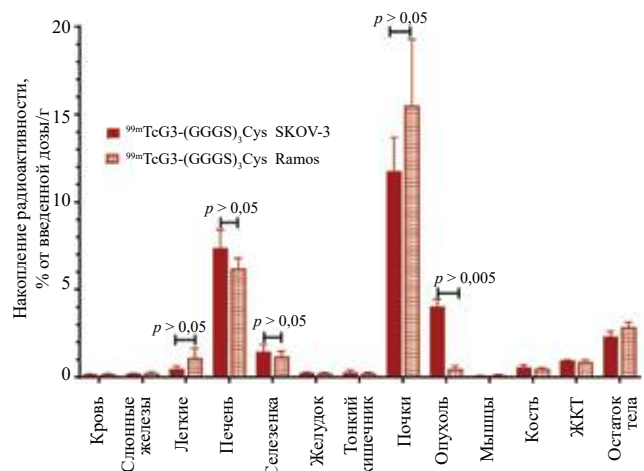


Рис. 2. Сравнительное биораспределение  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  через 4 ч после инъекции в ксенотрансплантатах SKOV-3 (высокая экспрессия HER2/neu) и Ramos (отрицательная экспрессия HER2/neu) у мышей Nu/j. Данные для желудочно-кишечного тракта с его содержимым и остаток тела представлены в виде %ВД на весь образец, для пяти мышей – в виде среднего значения %ВД/г ± стандартное отклонение

Поскольку прямого сравнения на одной партии мышей  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$ , полученного из лиофилизата, и  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$ , полученного из раствора белка, не подвергавшегося технологическим воздействиям, в данной работе не проводилось, нет возможности достоверно утверждать, есть ли какие-либо изменения в функциональной пригодности белка из лиофилизата. Однако если сравнить с опубликованными нами ранее данными [19] о биораспределении и целевых свойствах у мышей Nu/J, несущих SKOV-3 ксенотрансплантаты, то белок из лиофилизата в подобранной композиции имеет схожие свойства, как и нативный белок.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования *in vitro* и *in vivo* подтвердили функциональную пригодность лиофилизата целевых каркасных белков с анкириновыми повторами DARPin  $\text{G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$ , меченых  $^{99m}\text{Tc}$ , для радионуклидной визуализации гиперэкспрессии HER2/neu в злокачественных опухолях. Радиокомплекс  $^{99m}\text{Tc-G3-(GGGS)}_3\text{Cys}$  изготавливается с высокой радиохимической чистотой без дополнительной очистки, специфически связывается с HER2/neu в опухолевых клетках, стабилен *in vivo* и имеет благоприятное биораспределение для дальнейшей трансляции в клинические исследования.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Roskoski R. Jr. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.* 2019;139:395–411. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.11.014.
- Swain S.M., Shastry M., Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2023;22(2):101–126. DOI: 10.1038/s41573-022-00579-0.
- Giordano S.H., Franzoi M.A.B., Temin S., Anders C.K., Chandrapaty S., Crews J.R. et al. Systemic therapy for advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: ASCO guideline update. *J. Clin. Oncol.* 2022;40(23):2612–2635. DOI: 10.1200/jco.22.00519.
- Al-Batran S.E., Moorahrend E., Maintz C., Goetze T.O., Hempel D., Thuss-Patience P. et al. Clinical practice observation of trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *Oncologist.* 2020;25(8):e1181–1187. DOI: 10.1634/theoncologist.2020-0109.
- Swain S.M., Miles D., Kim S.B., Im Y.H., Im S.A., Semiglazov V. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):519–530. DOI: 10.1016/s1470-2045(19)30863-0.
- Lorusso D., Hilpert F., González Martin A., Rau J., Ottevaner P., Greimel E. et al. Patient-reported outcomes and final overall survival results from the randomized phase 3 PENELOPE trial evaluating pertuzumab in low tumor human epidermal growth factor receptor 3 (HER3) mRNA-expressing platinum-resistant ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2019;29(7):1141–1147. DOI: 10.1136/ijgc-2019-000370.
- Li B.T., Smit E.F., Goto Y., Nakagawa K., Udagawa H., Mazières J. et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-mutant non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2022;386(3):241–251. DOI: 10.1056/NEJMoa2112431.
- Tymon-Rosario J., Siegel E.R., Bellone S., Harold J., Adjei N., Zeybek B. et al. Trastuzumab tolerability in the treatment of advanced (stage III-IV) or recurrent uterine serous carcinomas that overexpress HER2/neu. *Gynecol. Oncol.* 2021;163(1):93–99. DOI: 10.1016/j.ygyno.2021.07.033.
- Modi S., Jacot W., Yamashita T., Sohn J., Vidal M., Tokunaga E. et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-Low advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2022;387(1):9–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2203690.
- Брагина О.Д., Деев С.М., Гарбуков Е.Ю., Гольдберг В.Е., Чернов В.И., Толмачев В.М. Прямое сравнение диагностической эффективности радиофармацевтических препаратов на основе альтернативных каркасных протеинов [99mTc] Tc-ADAPT6 и [99mTc] Tc-(HE) 3-G3 у больных HER2-позитивным раком молочной железы. *Бюллетень сибирской медицины.* 2023;22(3):6–13.
- Sörensen J., Velikyan I., Sandberg D., Wennborg A., Feldwisch J., Tolmachev V. et al. Measuring HER2-receptor expression in metastatic breast cancer using [68Ga]ABY-025 affibody PET/CT. *Theranostics.* 2016;6(2):262–271. DOI: 10.7150/thno.13502.
- Deyev S., Vorobyeva A., Schulga A., Proshkina G., Güler R., Löfblom J. et al. Comparative evaluation of two DARPIn variants: effect of affinity, size, and label on tumor targeting properties. *Mol. Pharm.* 2019;16(3):995–1008. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00922.
- Bragina O., Chernov V., Larkina M., Rybina A., Zelchan R., Garbukov E. et al. Phase I clinical evaluation of (99m)Tc-labeled affibody molecule for imaging HER2 expression in breast cancer. *Theranostics.* 2023;13(14):4858–4871. DOI: 10.7150/thno.86770.
- Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015;55:489–511. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654.
- Goldstein R., Sosabowski J., Livanos M., Leyton J., Vigor K., Bhavsar G. et al. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2015;42(2):288–301. DOI: 10.1007/s00259-014-2940-2.
- Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M. et al. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of (99m)Tc-labeled DARPIn G3. *Sci. Rep.* 2019;9(1):9405. DOI: 10.1038/s41598-019-45795-8.
- Tolmachev V., Orlova A., Sörensen J. The emerging role of radionuclide molecular imaging of HER2 expression in breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2021;72:185–197. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.10.005.
- Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A. et al. Phase I trial of (99m)Tc-(HE) (3)-G3, a DARPIn-based probe for imaging of HER2 expression in breast cancer. *J. Nucl. Med.* 2022;63(4):528–535. DOI: 10.2967/jnumed.121.262542.
- Larkina M., Plotnikov E., Bezverkhniaia E., Shabanova Y., Tretyakova M., Yuldasheva F. et al. Comparative preclinical evaluation of peptide-based chelators for the labeling of DARPIn G3 with (99m)Tc for radionuclide imaging of HER2 expression in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(21). DOI: 10.3390/ijms232113443.
- Malakhov M.P., Mattern M.R., Malakhova O.A., Drinker M., Weeks S.D., Butt T.R. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics.* 2004;5(1-2):75–86. DOI: 10.1023/b:Jsfg.0000029237.70316.52.
- Cleland J.L., Jones A.J. Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in biodegradable microspheres. *Pharm. Res.* 1996;13(10):1464–1475. DOI: 10.1023/a:1016063109373.
- Riihimäki M., Thomsen H., Sundquist K., Sundquist J., Hemminki K. Clinical landscape of cancer metastases. *Cancer Med.* 2018;7(11):5534–5542. DOI: 10.1002/cam4.1697.
- Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Hober S., Deyev S. et al. direct intra-patient comparison of scaffold protein-based tracers, [(99m)Tc]Tc-ADAPT6 and [(99m)Tc]Tc-(HE)3-G3, for imaging of HER2-positive breast cancer. *Cancers (Basel).* 2023;15(12). DOI: 10.3390/cancers15123149.
- Bragina O., von Witting E., Garousi J., Zelchan R., Sandström M.,



Orlova A. et al. Phase I study of (99m)Tc-ADAPT6, a scaffold protein-based probe for visualization of HER2 expression

in breast cancer. *J. Nucl. Med.* 2021;62(4):493–499. DOI: 10.2967/jnumed.120.248799.

---

## Вклад авторов

Варвашеня Р.Н. – проведение радиохимических исследований, выполнение экспериментов *in vivo*, *in vitro*, подготовка текста статьи. Прач А.А. – выполнение экспериментов *in vivo*, *in vitro*. Плотников Е.В., Ларькина М.С. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи. Деев С.М. – разработка концепции и дизайна исследования. Белоусов М.В. – интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания. Чернов В.И. – обоснование рукописи, разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, подготовка текста статьи.

---

## Информация об авторах

**Варвашеня Руслан Николаевич** – аспирант, лаборант-исследователь, НОЛХФИ, СибГМУ, г. Томск, [mr.varvashenya@mail.ru](mailto:mr.varvashenya@mail.ru), <http://orcid.org/0009-0002-4282-3198>

**Прач Анастасия Александровна** – аспирант, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск, [nastya.prach@mail.ru](mailto:nastya.prach@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-6975-2361>

**Плотников Евгений Владимирович** – канд. хим. наук, доцент, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск, [plotnikovev@tpu.ru](mailto:plotnikovev@tpu.ru), ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4374-6422>

**Деев Сергей Михайлович** – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, руководитель лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, [biomem@mail.ru](mailto:biomem@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-3952-0631>

**Белоусов Михаил Валерьевич** – д-р фармацевт. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск, [belousov.mv@ssmu.ru](mailto:belousov.mv@ssmu.ru), <http://orcid.org/0000-0002-2153-7945>

**Ларькина Мария Сергеевна** – д-р фармацевт. наук, профессор, кафедра фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск, [marialarkina@mail.ru](mailto:marialarkina@mail.ru), ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1176-2441>

**Чернов Владимир Иванович** – член-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения радионуклидной диагностики, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, [chernov@tnimc.ru](mailto:chernov@tnimc.ru), <http://orcid.org/0000-0001-8753-7916>

(✉) **Варвашеня Руслан Николаевич**, [mr.varvashenya@mail.ru](mailto:mr.varvashenya@mail.ru)

Поступила в редакцию 21.03.2024;  
одобрена после рецензирования 27.05.2024;  
принята к публикации 30.05.2024