

## ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ $^{177}\text{Lu}$ и $^{212}\text{Pb}$ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

© 2023 г. А. А. Артюхов<sup>1</sup>, В. А. Головаченко<sup>4</sup>, С. М. Деев<sup>2,5</sup>, Б. В. Егорова<sup>1</sup>, К. В. Коков<sup>1,\*</sup>, Т. М. Кузнецова<sup>1</sup>, А. В. Курочкин<sup>1</sup>, Е. Н. Лебеденко<sup>2,5</sup>, К. А. Маковеева<sup>1</sup>, А. А. Панкратов<sup>3</sup>, А. Д. Плотинская<sup>3</sup>, М. А. Прошин<sup>1</sup>, Д. Ю. Чувилин<sup>1</sup>, А. А. Шульга<sup>2,5</sup>, А. Д. Каприн<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский научный исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал “Национального медицинского исследовательского центра радиологии” Минздрава России, Москва, Россия

<sup>4</sup> ОАО “Технология медицинских полимеров”, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

\*E-mail: Kokov\_KV@nrcki.ru

Поступила в редакцию 23.06.2021 г.

После доработки 15.10.2021 г.

Принята к публикации 18.10.2021 г.

Проведены синтез и исследование нового комплексного соединения для таргетной терапии рака молочной железы. В качестве нацеливающего агента использовали скаффолдовый полипептид ZHER2, специфичный к эпитопу внеклеточного домена трансмембранного рецептора HER2, который был конъюгирован с молекулой-носителем человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) с присоединенным к нему хелатирующим агентом DOTA. Реакцию радиомеченной молекулы ZHER2–ЧСА–DOTA проводили с радионуклидом  $^{177}\text{Lu}$ , а также  $^{212}\text{Pb}$ , полученным на разработанном лабораторном генераторе. Радиохимическая чистота меченного препарата  $^{177}\text{Lu}$  составила  $57 \pm 10\%$ , меченного  $^{212}\text{Pb}$  –  $72 \pm 5\%$ . Степень диссоциативной устойчивости этих соединений составила  $73 \pm 8\%$  для  $^{177}\text{Lu}$  и более 90% для  $^{212}\text{Pb}$ . Испытания цитотоксической активности полученных адресных радиоактивных соединений [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA и [ $^{212}\text{Pb}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA, проведенные *in vitro* на линиях опухолевых клеток, показали значимый уровень ингибирования пролиферации клеток рака молочной железы человека SK-BR-3 и BT474 с гиперэкспрессией онкомаркера HER2/neu в отличие от клеток протоковой аденокарциномы молочной железы MCF-7 с низким уровнем экспрессии HER2/neu.

DOI: 10.56304/S1992722322030025

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений развития современной онкологии является разработка новых подходов к таргетной терапии опухолевых заболеваний, в том числе с применением соединений, включающих в себя действующий компонент (радионуклиды, низкомолекулярные и белковые токсины и др.), поражающий клетку, и направляющий или адресный компонент, обеспечивающий адресную доставку действующего компонента к опухолевой клетке определенного молекулярного профиля. При адресном воздействии на опухолевые ткани основной задачей является повышение концентрации действующих агентов, в частности радиоактивных изотопов, непосредственно в опухоли за счет их целевой селективной достав-

ки, что позволяет существенно снизить терапевтические дозы и уменьшить системную интоксикацию организма.

Сегодня рак молочной железы (РМЖ) является самым частым злокачественным новообразованием среди женщин. Одна из наиболее неблагоприятных форм РМЖ HER2-положительный рак молочной железы встречается примерно в 20–25% случаев и характеризуется агрессивным течением, высоким риском метастазирования и низкими показателями выживаемости [1]. Гиперэкспрессия HER2 встречается также в клетках рака яичника, желудка, поджелудочной железы, глиобластомы. 20 лет назад HER2-положительный РМЖ считался плохо поддающимся лечению. В настоящее время большинство пациентов

с подобным диагнозом может быть вылечено, в том числе, благодаря импортным инновационным лекарственным препаратам на основе моноклональных антител (Трастузумаб, Пертузумаб, Кацила производства F. Hoffmann-La Roche, Швейцария) и пока единственному российскому дженерику Гертикад (Биокад).

В этой связи цель данной работы – создание российского таргетного радиофармпрепарата (РФП) для радионуклидной терапии (РНТ) HER2-положительных опухолей.

Традиционно для целевой доставки действующих агентов к опухоли используют моноклональные антитела или их фрагменты, которые имеют целый ряд недостатков принципиального и технологического характера [2]. В настоящей работе в качестве альтернативы антителам для нацеливания создаваемого РФП на опухолевые HER2-положительные клетки-мишени использовали рекомбинантный адресный скаффолдовый полипептид ZHER2, специфичный к эпитопу внеклеточного домена трансмембранного рецептора HER2, не совпадающему с эпитопами связывания Трастузумаба и Пертузумаба [3]. При разработке таргетных препаратов наряду с общей эффективностью препарата, зависящей от механизма действующего агента, необходимо учитывать другие характеристики, предопределяющие эффективность доставки и фармакокинетику носителя [4, 5]. Для обеспечения оптимального размера создаваемой конструкции, а также увеличения времени циркуляции в кровотоке и улучшения фармакокинетических показателей в качестве биodeградируемого носителя РФП в настоящей работе применен человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) [6].

В составе РФП в качестве терапевтического агента, воздействующего на опухолевую клетку, использовали короткоживущие радионуклиды –  $\beta$ -эмиттеры  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{212}\text{Pb}$ . Использование радионуклидов в качестве терапевтических агентов в составе таргетных препаратов для РНТ имеет преимущества перед другими действующими агентами, например токсинами, поскольку для радионуклидов неизвестен феномен множественной лекарственной устойчивости (*multidrug resistance*), а также благодаря так называемому эффекту “перекрестного огня” (*cross-fire effect*), т.е. облучению опухолевых клеток радионуклидами, доставленными к их злокачественным соседям [7].

## МЕТОДЫ

*Получение адресного полипептида ZHER2.* Плазмидный вектор pET39-ZHER2-Cys с геном мутантного варианта полипептида ZHER2, содержащего остаток цистеина и олигогистидиновый фрагмент, получен путем мутагенеза с

помощью ПЦР на основе информации об аминокислотной последовательности адресного полипептида ZHER2 из учетной записи 3MZW в банке данных PDB (<https://www.rcsb.org/structure/3MZW>) с учетом частоты употребления кодонов в *Escherichia coli*. Рекомбинантный полипептид ZHER2 (молекулярная масса 8.2 кДа, специфическое связывание с HER2 с  $K_D = 22$  pM) наработан в клетках *E. coli* BL21(DE3) [pET39-ZHER2-Cys] и выделен с помощью аффинной хроматографии.

*Биodeградируемый носитель РФП – ZHER2-ЧСА-DOTA.* Конъюгат ЧСА-DOTA получен путем конъюгации ЧСА с NHS-эфиром DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан тетрауксусная кислота), служащим в качестве хелатирующего агента и способным образовывать прочные координационные связи с катионами металлов. Полученный конъюгат ЧСА-DOTA активировали гетеробифункциональным линкером sulfo-SIAB и конъюгировали с HER2-специфичным полипептидом ZHER2. В результате в качестве адресного носителя РФП получен биоконъюгат ZHER2-ЧСА-DOTA. Соотношение компонентов в полученных конъюгатах варьируется в зависимости от условий конъюгации. Состав конъюгата, использованного в работе: ZHER2-ЧСА-DOTA (одна-две молекулы ZHER2 на одну условную молекулу конъюгата; 4.1 молекулы DOTA на одну условную молекулу конъюгата; суммарная молекулярная масса ~90 кДа).

*Получение радионуклидов.* Схема распада радионуклидов  $^{212}\text{Pb}$  и  $^{177}\text{Lu}$ , использованных для получения РФП, показана на рис. 1. Радионуклид  $^{177}\text{Lu}$  получали “непрямым” методом – облучением оксида  $\text{Yb}_2\text{O}_3$ , обогащенного (99.8%) по изотопу  $^{176}\text{Yb}$  [8]. Оксид иттербия был герметично упакован в кварцевую ампулу, помещаемую в ампульное устройство, которое затем заваривали для облучения на исследовательском реакторе ИР-8 (НИЦ “Курчатовский институт”, г. Москва). После облучения ампулу вскрывали и переводили оксид иттербия в раствор, из которого отбирали пробу для измерения накопленной активности. Измерения активности проводили на  $\gamma$ -спектрометре Canberra GL0515R, обработку спектров выполняли в программе GRANIT с библиотекой констант, сформированной на основе базы рекомендованных данных NUDAT-2 (МАГАТЭ). Выделение  $^{177}\text{Lu}$  проводили методом цементации [9]. После выделения  $^{177}\text{Lu}$  получали в конечной форме  $^{177}\text{LuCl}_3$  в растворе 0.1 M HCl. Объемная активность  $^{177}\text{Lu}$  непосредственно перед проведением работ составляла 90 МБк/мл.

Радионуклид  $^{212}\text{Pb}$  в виде  $^{212}\text{PbCl}_2$  получали с помощью разработанного генератора  $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$ . Для получения радионуклида  $^{212}\text{Pb}$  был разрабо-

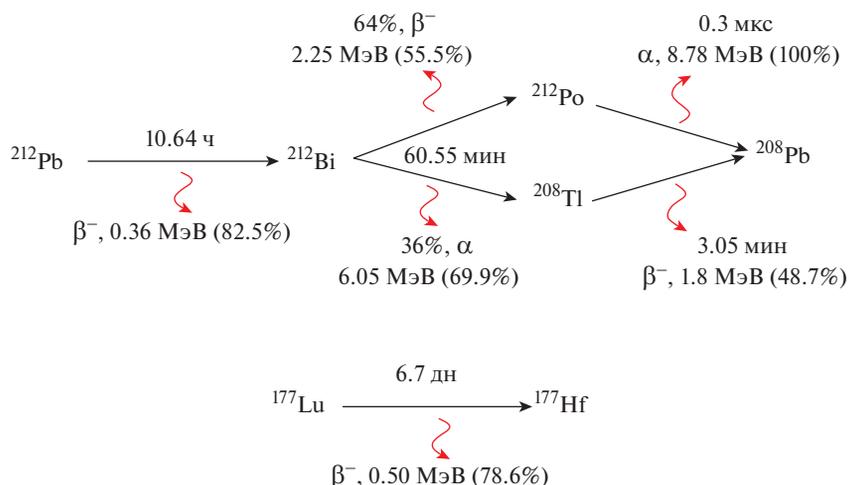


Рис. 1. Цепочки распада  $^{212}\text{Pb}$  и  $^{177}\text{Lu}$ .

тан генератор  $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$ , принципиальная схема которого показана на рис. 2. Реактор генератора, ограниченный пористыми политетрафторэтиленовыми мембранами, содержит смесь изотопов тория, в состав которой входит радионуклид  $^{228}\text{Th}$  ( $T_{1/2}$  1.9 г). В цепочке распада  $^{228}\text{Th}$  присутствует газообразный радионуклид  $^{220}\text{Rn}$  ( $T_{1/2}$  56 с), который в результате диффузии попадает в полипропиленовый накопитель и в результате ряда распадов переходит в  $^{212}\text{Pb}$  ( $T_{1/2}$  10.64 ч) и осаждается на его внутренних стенках. В качестве элюента для смыва  $^{212}\text{Pb}$  со стенок сосудов накопителя использовали раствор 0.1 М НСl (рН 1.0). Объемная активность наработанного на генераторе  $^{212}\text{Pb}$  составляла 400 кБк/мл.

**Радиоактивное мечение биоконъюгата ZHER2–ЧСА–ДОТА.** К полученному раствору радионуклида  $^{177}\text{Lu}$  или  $^{212}\text{Pb}$  объемом 0.4–0.8 мл добавляли 1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в 1/10 части от общего объема реакционной смеси, также во избежание денатурации белкового носителя ZHER2–ЧСА–ДОТА в процессе мечения доводили рН смеси концентрированным раствором NaOH до значения 5.5–6.5. Затем для связывания  $^{177}\text{Lu}$  или  $^{212}\text{Pb}$  в полученный раствор добавляли 100–125 мкл раствора биоконъюгата ZHER2–ЧСА–ДОТА в концентрации 1 мг/мл и инкубировали в течение 60 мин при температуре 60°C с кратковременным перемешиванием каждые ~15 мин. После охлаждения сосуда со смесью выделяли целевые конъюгаты  $^{177}\text{Lu}/^{212}\text{Pb}$  ZHER2–ЧСА–ДОТА методом эксклюзионной хроматографии.

Радиометрический анализ всех радиоактивных образцов, где не оговорено специально, проводили по площади фото-пиков  $\gamma$ -линий 239 и 208 кэВ от распадов  $^{212}\text{Pb}$  и  $^{177}\text{Lu}$  соответственно, измеренных полупроводниковым Ge-детекто-

ром, соединенным с многоканальным анализатором (ORTEC GEM-25185).

*Выделение целевых конъюгатов  $^{177}\text{Lu}/^{212}\text{Pb}$  ZHER2–ЧСА–ДОТА.* Радиохимическую чистоту (РХЧ) меченого соединения опре-

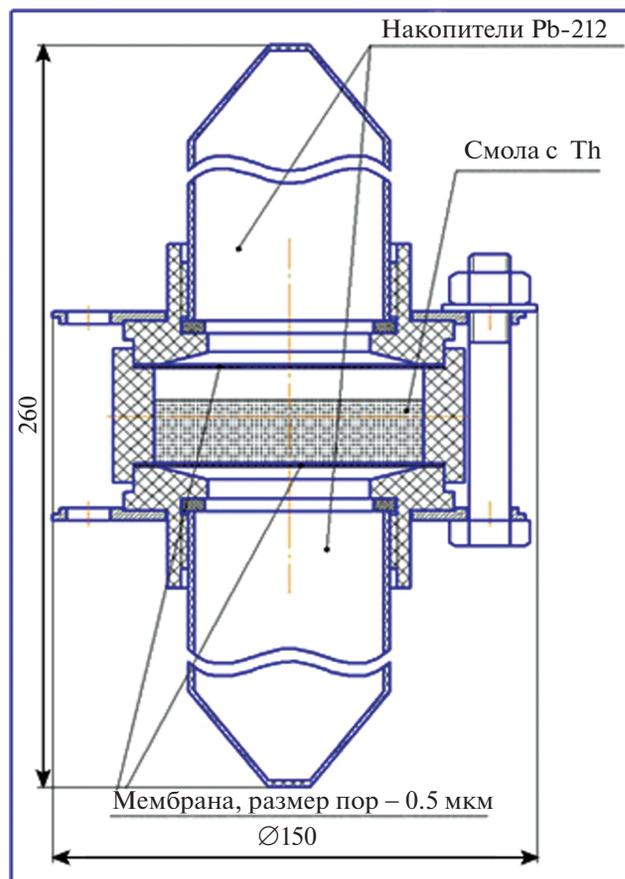
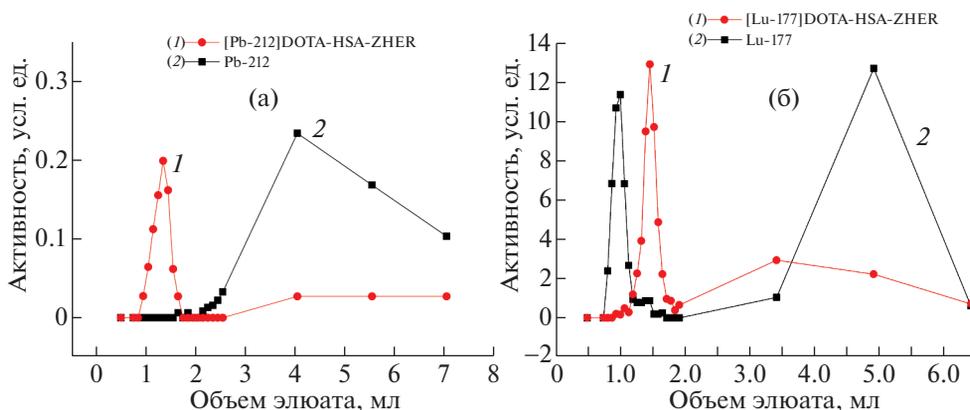


Рис. 2. Принципиальная схема генератора  $^{212}\text{Pb}$ .



**Рис. 3.** Результаты эксклюзионной хроматографии на гель-фильтрационной колонке (ГФК) Illustra NAP-5 Column (GE HealthCare) конъюгатов ZHER2-ЧСА-DOTA, меченных радиоактивными изотопами  $^{212}\text{Pb}$  (а) и  $^{177}\text{Lu}$  (б) (кривые 1). Калибровка ГФК свободными изотопами  $^{212}\text{Pb}$  (а) и  $^{177}\text{Lu}$  (б) (кривые 2).

деляли методом эксклюзионной хроматографии на гель-фильтрационной колонке (ГФК) Illustra NAP-5 Column (GE HealthCare), уравновешенной 0.1 М MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота). Радиоактивно меченые конъюгаты элюировали тем же буфером, а не связавшиеся с конъюгатом радионуклиды смывали раствором 0.1 М лимонной кислоты. РХЧ определяли как процентное отношение суммарной активности всех фракций, содержащих радиоконъюгат, к суммарной активности во всех фракциях смывочных растворов.

**Исследование устойчивости комплексов.** Диссоциативную устойчивость полученных РФП определяли по РХЧ препарата после выдержки при  $37^\circ\text{C}$  в растворе 0.9% NaCl или эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС) (HyClone Laboratories) в течение 1, 2 и 3 ч в случае  $^{212}\text{Pb}$  и 1, 2 и 3 сут в случае  $^{177}\text{Lu}$  методом эксклюзионной хроматографии на ГФК, как описано выше. Устойчивость рассчитывали как процентное отношение радиоактивности в элюате к суммарной активности нанесенного на ГФК препарата.

**Оценка цитотоксической активности РФП.** Для оценки цитотоксической активности РФП использовали линии клеток РМЖ человека SK-BR-3 и BT474 с гиперэкспрессией онкомаркера HER2/neu. Линию клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 с низким уровнем экспрессии HER2/neu использовали в качестве “отрицательного” контроля.

Опухолевые клетки культивировали в пластиковых флаконах с поверхностью роста клеток  $25\text{ см}^2$  (Costar, США) на среде RPMI-1640 (культуры клеток BT-474, SK-BR-3) и Игла (культура клеток MCF-7) с L-глутамином и добавлением 10% ЭТС (ПанЭко, Россия) при  $37^\circ\text{C}$  во влажной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$ -инкубатор Binder, Гер-

мания). В работе использовали клеточные линии от трех до семи пассажей. Концентрацию клеток выбирали с таким расчетом, чтобы воздействие приходилось на экспоненциальную (логарифмическую) фазу роста. В лунку, содержащую адгезированные клетки, добавляли по 100 мкл исследуемых субстанций РФП, приготовленных на культуральной среде в двукратных последовательных разведениях. В контрольные лунки вносили по 100 мкл стерилизованных мембранной фильтрацией растворов не связанных с биоконъюгатом радионуклидов  $^{177}\text{Lu}$  (в форме соли цитрата лютеция в 0.1 М лимонной кислоте с рН, доведенным добавлением концентрированной NaOH до значения 6.0) и  $^{212}\text{Pb}$  в 0.1 MES-буфере (рН 6.0) в активностях, равных радиоактивной метке. В каждом случае оставляли контрольные лунки без радионуклидов, в которые вносили соответствующее количество среды или среды, содержащей эквивалентное количество MES-буфера. Далее клетки инкубировали 24 или 72 ч и проводили оценку их выживаемости с помощью МТТ-теста по стандартной методике. Мерой цитотоксичности служила процентная доля погибших клеток. Все тесты проводили в триплетах, величины оптической плотности, полученные в трех независимых лунках, усредняли.

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое ( $M$ ) и стандартную ошибку среднего ( $m$ ). Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica v. 10.0. Достоверность различий между группами данных оценивали с применением  $t$ -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

**Таблица 1.** Устойчивость [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA

Среда	24 ч	48 ч	72 ч
ЭТС	73 ± 7%	71 ± 9%	75 ± 9%
Изотонический раствор	70 ± 9%	71 ± 7%	78 ± 9%

**Таблица 2.** Устойчивость [ $^{212}\text{Pb}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA

Среда	1 ч	2 ч	3 ч
ЭТС	96 ± 3%	99 ± 5%	94 ± 3%
Изотонический раствор	92 ± 3%	93 ± 5%	94 ± 4%

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Получение меченых биоконъюгатов ZHER2–ЧСА–DOTA.* Мечение конъюгата ZHER2–ЧСА–DOTA проводили полученными в настоящей работе  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{212}\text{Pb}$ . Для проведения очистки полученного меченого конъюгата [ $^{177}\text{Lu}/^{212}\text{Pb}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA от несвязавшегося изотопа с помощью ГФК калибровали путем пропускания через колонку свободных радионуклидов с отбором 0.1 мл элюатов, что позволило построить кривые элюирования свободных радионуклидов  $^{177}\text{Lu}/^{212}\text{Pb}$  (рис. 3, кривые 2). Видно, что в случае очистки [ $^{212}\text{Pb}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA белковая фракция полностью отделяется от фракции со свободным  $^{212}\text{Pb}$ , которая, в свою очередь, смывается с колонки раствором 0.1 М лимонной кислоты (рис. 3а, кривая 1). В случае с [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA часть свободного радионуклида выходит также в нулевой фракции, при этом перекрытие пиков происходит в координате 1.25 мл (рис. 3б, кривая 1). В этой связи от-

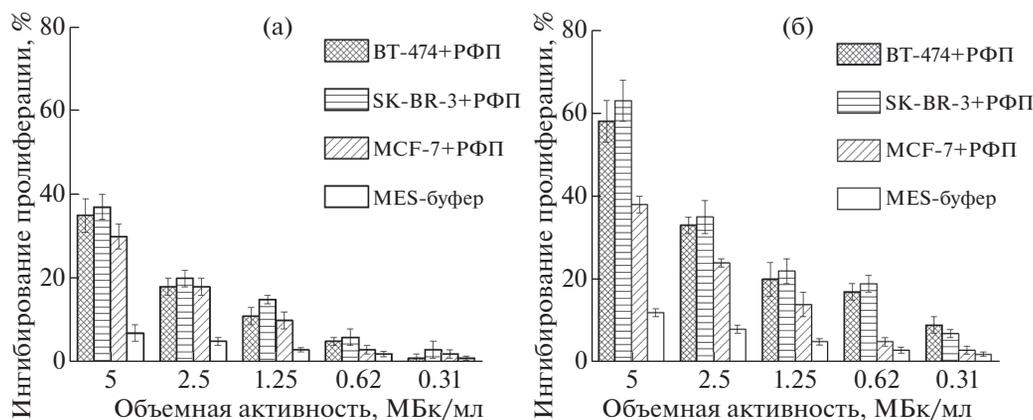
бор меченой  $^{177}\text{Lu}$  белковой фракции проводили начиная с координаты 1.25 мл.

Для подтверждения наличия белка в аликвоты добавляли реагент Кумасси, в результате чего образец, содержащий белок, окрашивался. Было обнаружено, что фракции, следующие за нулевой, за исключением фракций смыва раствором лимонной кислоты, содержат в себе белковую компоненту, что подтвердило корректность указанной схемы разделения.

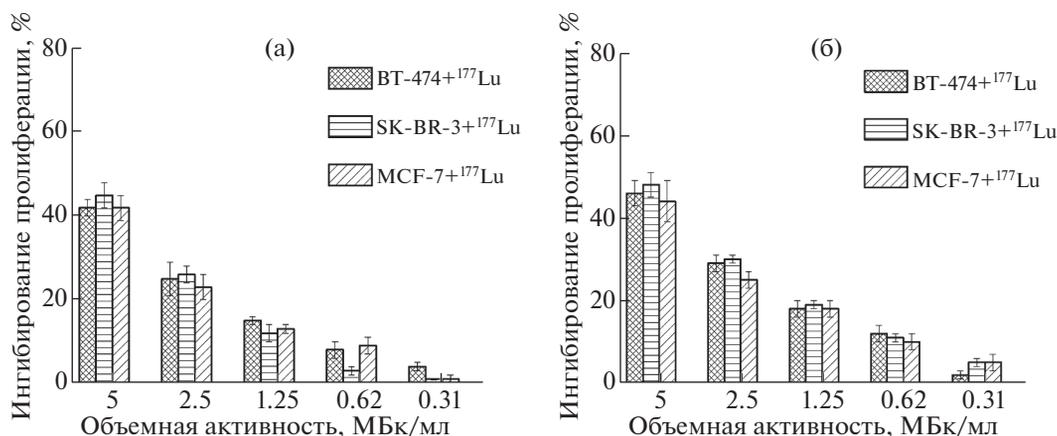
В этих условиях радиохимическая чистота меченого  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{212}\text{Pb}$  комплекса ZHER2–ЧСА–DOTA составила  $57 \pm 10$  и  $72 \pm 5\%$  соответственно. Причина такого уровня РХЧ заключается в отношении количества свободных катионов к количеству хелаторов на поверхности молекул ЧСА. Широко известно, что на РХЧ препарата влияет не только концентрация ионов целевого радионуклида, но и концентрация примесных металлов. Меньшего содержания примесных ионов (железа, меди, цинка и др.) можно добиться очищением раствора, в частности, методами ионообменной хроматографии.

После разделения на ГФК наиболее активные фракции объединили для дальнейшего использования в экспериментах по цитотоксичности. Во всех случаях перед добавлением меченого конъюгата к среде pH доводили до биологически совместимых значений (pH 5.5–6.5). Объемная активность радиоактивно меченых биоконъюгатов перед применением на клеточных культурах составила 5 МБк/мл для [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA и 80 кБк/мл для [ $^{212}\text{Pb}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA.

*Определение устойчивости комплексов.* Исследуемый образец [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA (1.5 МБк, 1 мл) разделяли на две равные части, затем добавляли к изотоническому раствору и среде ЭТС при температуре 37°C в отношении объемов



**Рис. 4.** Цитотоксическая активность адресного радиоактивного конъюгата [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA в отношении опухолевых клеток РМЖ человека с высоким (BT-474, SK-BR-3) и низким (MCF-7) уровнем экспрессии онкомаркера HER2/neu при воздействии в течение 24 (а) и 72 ч (б). Различия статистически достоверны ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 5.** Цитотоксическая активность  $^{177}\text{Lu}$  в виде соли относительно опухолевых клеток РМЖ человека с высоким (BT-474, SK-BR-3) и низким (MCF-7) уровнем экспрессии онкомаркера HER2/neu при воздействии в течение 24 (а) и 72 ч (б). Различия статистически достоверны ( $p < 0.05$ ).

препарата и сред 1 : 1. Через 24, 48, 72 ч из каждой из образованных смесей отбирали аликвоту с последующим элюированием на ГФК и расчетом устойчивости.

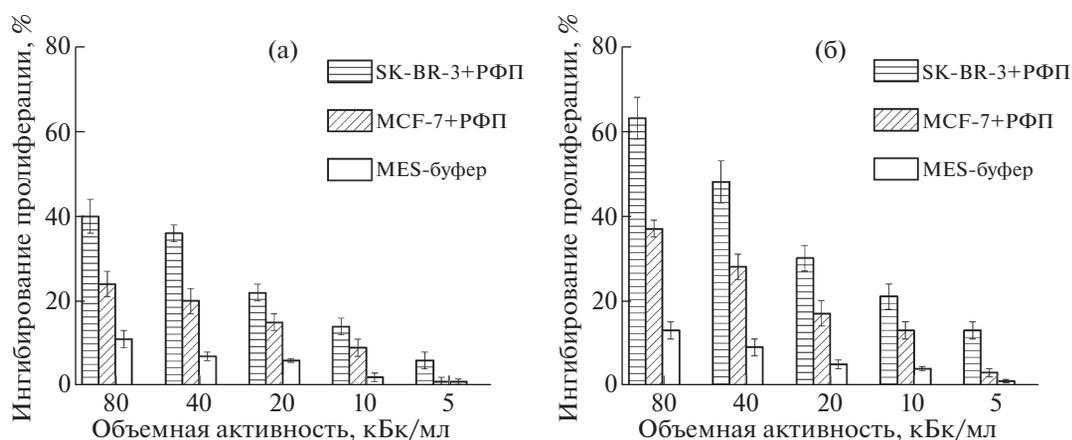
Исследуемый образец [ $^{212}\text{Pb}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA (40 кБк, 0.5 мл) добавляли к среде ЭТС при температуре  $37^\circ\text{C}$  в отношении 1 : 1. В препарат, содержащий  $^{212}\text{Pb}$  (56 кБк, 1 мл), добавляли 110 мкл раствора 1.5 М NaCl, так что итоговая концентрация NaCl в смеси составляла значение изотонического раствора. Через 1, 2, 3 ч из каждой из образованных смесей отбирали аликвоту с последующим элюированием на ГФК и расчетом устойчивости. В табл. 1, 2 приведены величины устойчивости для конъюгатов, меченных  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{212}\text{Pb}$  соответственно. Величины даны в процентах как значение  $\pm$  предельное отклонение. Видно, что на протяжении 72 ч устойчивость [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA сохраняется на уровне  $73 \pm 8\%$ , а соединение [ $^{212}\text{Pb}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA сохраняет устойчивость более 90% на протяжении 3 ч. Отметим, что устойчивость соединения может быть переоценена в случае, если часть катионов покинула комплекс и связалась с лигандами сыворотки, такими как альбумин или трансферрин, которые не подверглись разделению с комплексом. Для верификации результатов по устойчивости следует проводить анализ с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Оценка цитотоксической активности РФП.** Результаты исследований [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA представлены на рис. 4. При 24-часовой инкубации опухолевых клеток линий BT-474 и SK-BR-3 в присутствии РФП [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA при максимальной объемной активности 5 МБк/мл цитотоксическая активность

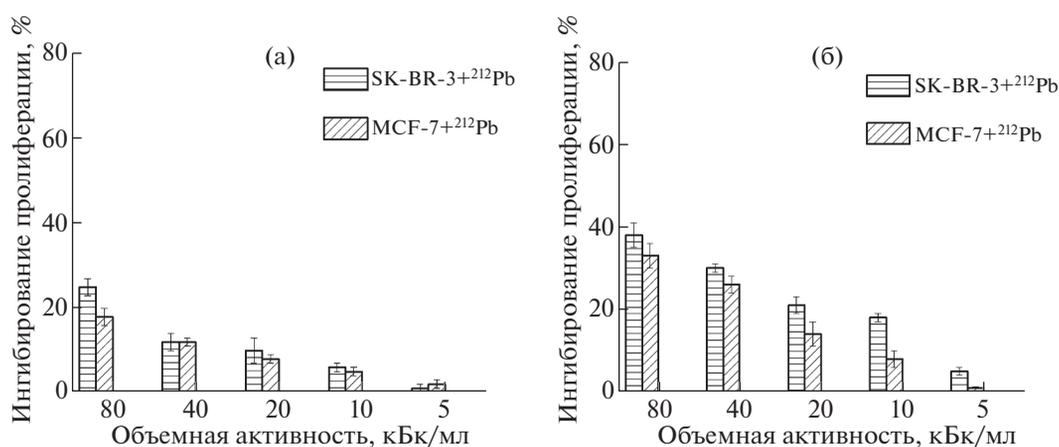
РФП была низкой: ингибирование пролиферации не превысило 35–38% (рис. 4а). Сопоставимую активность относительно клеток в культуре проявлял и не связанный с биоконъюгатом  $^{177}\text{Lu}$  в виде соли.

При увеличении времени инкубации до 72 ч цитотоксическая активность [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA значительно возрастала относительно клеток, которые гиперэкспрессировали онкомаркер HER2/neu, что выражалось в ингибировании роста клеток в культуре на 58–63% при объемной активности РФП 5 МБк/мл (рис. 4б), и не изменялась в отношении клеток MCF-7 с низким уровнем экспрессии HER2/neu. При этом цитотоксическая активность  $^{177}\text{Lu}$  в виде соли не зависела от времени инкубации с клетками (рис. 5). Таким образом, показано, что [ $^{177}\text{Lu}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA обладает специфической цитотоксической активностью только относительно опухолевых клеток молочной железы человека линий BT-474 и SK-BR-3, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu.

Результаты исследований [ $^{212}\text{Pb}$ ]ZHER2–ЧСА–DOTA представлены на рис. 6. При инкубации клеток линии SK-BR-3 в течение 24 ч при объемных активностях  $^{212}\text{Pb}$  в диапазоне 5–80 кБк/мл было зафиксировано снижение числа живых клеток относительно контрольной группы (MES–буфер) (рис. 6а). Ингибирование пролиферации для опухолевых клеток культуры SK-BR-3 при объемной активности радионуклида в РФП 80 кБк/мл составило 40%, в то время как для контрольной линии MCF-7 при той же активности данная величина оказалась ниже примерно в 2 раза. С увеличением времени инкубации до 72 ч на клетках, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu (SK-BR-3), отмечено значительное



**Рис. 6.** Цитотоксическая активность адресного радиоактивного конъюгата  $[^{212}\text{Pb}]\text{ZHER2-ЧСА-DOTA}$  относительно опухолевых клеток РМЖ человека с высоким (SK-BR-3) и низким (MCF-7) уровнем экспрессии онкомаркера HER2/неу при воздействии в течение 24 (а) и 72 ч (б). Различия статистически достоверны ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 7.** Цитотоксическая активность  $^{212}\text{Pb}$  относительно опухолевых клеток РМЖ человека с высоким (SK-BR-3) и низким (MCF-7) уровнем экспрессии онкомаркера HER2/неу при воздействии в течение 24 (а) и 72 ч (б). Различия статистически достоверны ( $p < 0.05$ ).

увеличение цитотоксического эффекта: максимальное ингибирование пролиферации опухолевых клеток в культуре составило 63% при объемной активности 80 кБк/мл (рис. 6б). Отметим, что количество жизнеспособных клеток увеличивалось со снижением концентрации экспериментального образца препарата, т.е. выявлен дозозависимый цитотоксический эффект исследуемого РФП. Ингибирование пролиферации при использовании  $^{212}\text{Pb}$  в виде соли не превысило 48% (рис. 7). Таким образом, показано, что  $[^{212}\text{Pb}]\text{ZHER2-ЧСА-DOTA}$  обладает специфической цитотоксической активностью только в отношении линии SK-BR-3, гиперэкспрессирующей онкомаркер HER2/неу. Выявлено, что MES-буфер, тестируемый в качестве контроля, не оказывал цитотоксического действия на клетки в си-

стеме *in vitro* в выбранных концентрациях и временных диапазонах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан лабораторный генератор радионуклида  $^{212}\text{Pb}$  и получены два терапевтических РФП на основе короткоживущих  $\beta$ -эмиттеров  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{212}\text{Pb}$  и биосовместимого конъюгата ZHER2-ЧСА-DOTA, который представляет собой комплекс из адресного HER2-специфичного полипептида ZHER2, конъюгированного с ЧСА и хелатором DOTA. При проведении экспериментов в системе *in vitro* установлено, что РФП  $[^{177}\text{Lu}]\text{DOTA-ЧСА-ZHER2}$  (клеточные линии BT-474 и SK-BR-3) и  $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-ЧСА-ZHER2}$  (клеточная линия SK-BR-3) обладают специ-

ческой цитотоксической активностью в отношении клеток РМЖ человека, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu, которая выражалась в способности ингибировать рост HER2/neu позитивных опухолевых клеток в культуре.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости доклинического изучения разработанных РФП в системе *in vivo* на животных с привитыми опухолями, гиперэкспрессирующими HER2/neu.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поляновский О.Л., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. // Биохимия. 2012. Т. 77. Вып. 3. С. 289.
2. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е. и др. // Успехи химии. 2015. Т. 84. С. 1.
3. Шилова О.Н., Деев С.М. // Acta Naturae. 2019. V. 11 (4). P. 42.
4. Orlova A., Magnusson M., Eriksson T.L. et al. // Cancer Res. 2006. 66 (8). P. 4339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3521>
5. Deyev S.M., Vorobyeva A., Schulga A. et al. // Mol. Pharm. 2019. V. 16 (3). P. 995. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00922>
6. Pilati D., Howard K.A. // Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2020. V. 16 (9). P. 783. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1801633>
7. Volkert W.A., Hoffman T.J. // Chem. Rev. 1999. V. 99. P. 2269.
8. Dash A., Pillai M.R.A., Knapp F.F. Jr. // Nucl. Med. Mol. Imaging. 2015. V. 49. P. 85.
9. Su F.-M., Beaumier P., Axworthy D. et al. // Nucl. Med. Biol. 2005. V. 32. № 7. P. 741.