

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

© 2023 г. А. А. Артюхов¹, В. А. Головаченко⁴, С. М. Деев^{2,5}, Б. В. Егорова¹, К. В. Коков^{1,*}, Т. М. Кузнецова¹, А. В. Курочкин¹, Е. Н. Лебеденко^{2,5}, К. А. Маковеева¹, А. А. Панкратов³, А. Д. Плотинская³, М. А. Прошин¹, Д. Ю. Чувилин¹, А. А. Шульга^{2,5}, А. Д. Каприн³

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

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

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

⁴ ОАО “Технология медицинских полимеров”, Санкт-Петербург, Россия

⁵ 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}Lu , а также ^{212}Pb , полученным на разработанном лабораторном генераторе. Радиохимическая чистота меченного препарата ^{177}Lu составила $57 \pm 10\%$, меченного ^{212}Pb – $72 \pm 5\%$. Степень диссоциативной устойчивости этих соединений составила $73 \pm 8\%$ для ^{177}Lu и более 90% для ^{212}Pb . Испытания цитотоксической активности полученных адресных радиоактивных соединений [^{177}Lu]ZHER2–ЧСА–DOTA и [^{212}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 – β -эмиттеры ^{177}Lu и ^{212}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}Pb и ^{177}Lu , использованных для получения РФП, показана на рис. 1. Радионуклид ^{177}Lu получали “непрямым” методом – облучением оксида Yb_2O_3 , обогащенного (99.8%) по изотопу ^{176}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 γ -спектрометре Canberra GL0515R, обработку спектров выполняли в программе GRANIT с библиотекой констант, сформированной на основе базы рекомендованных данных NUDAT-2 (МАГАТЭ). Выделение ^{177}Lu проводили методом цементации [9]. После выделения ^{177}Lu получали в конечной форме $^{177}\text{LuCl}_3$ в растворе 0.1 M HCl. Объемная активность ^{177}Lu непосредственно перед проведением работ составляла 90 МБк/мл.

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

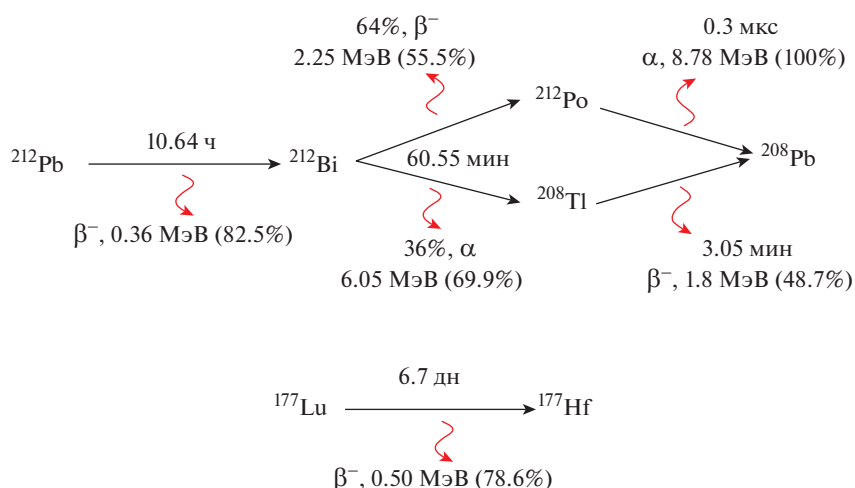


Рис. 1. Цепочки распада ^{212}Pb и ^{177}Lu .

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}Th ($T_{1/2}$ 1.9 г). В цепочке распада ^{228}Th присутствует газообразный радионуклид ^{220}Rn ($T_{1/2}$ 56 с), который в результате диффузии попадает в полипропиленовый накопитель и в результате ряда распадов переходит в ^{212}Pb ($T_{1/2}$ 10.64 ч) и осаждается на его внутренних стенках. В качестве элюента для смыва ^{212}Pb со стенок сосудов накопителя использовали раствор 0.1 М HCl (рН 1.0). Объемная активность наработанного на генераторе ^{212}Pb составляла 400 кБк/мл.

Радиоактивное мечение биоконъюгата ZHER2–ЧСА–ДОТА. К полученному раствору радионуклида ^{177}Lu или ^{212}Pb объемом 0.4–0.8 мл добавляли 1 М KH_2PO_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}Lu или ^{212}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 γ -линий 239 и 208 кэВ от распадов ^{212}Pb и ^{177}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-

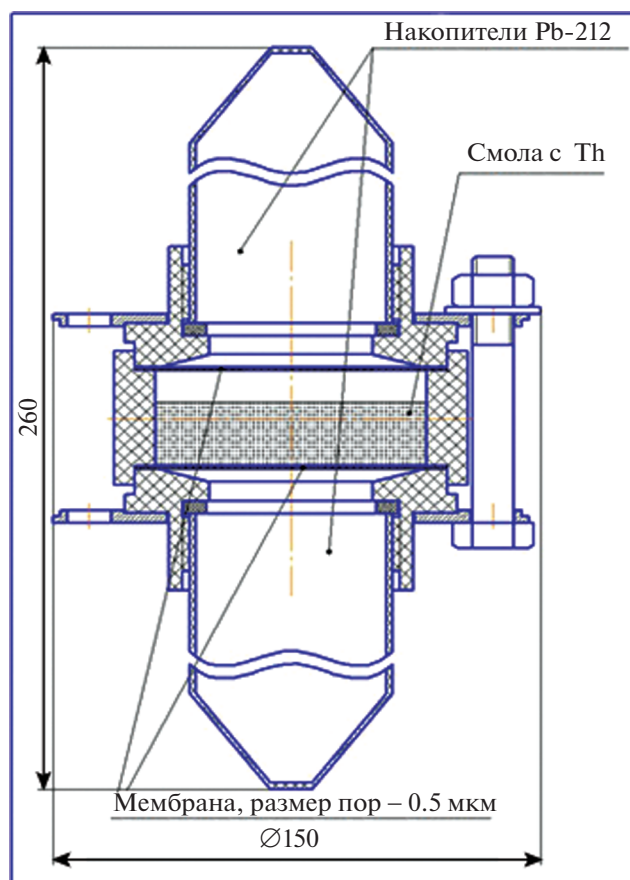


Рис. 2. Принципиальная схема генератора ^{212}Pb .

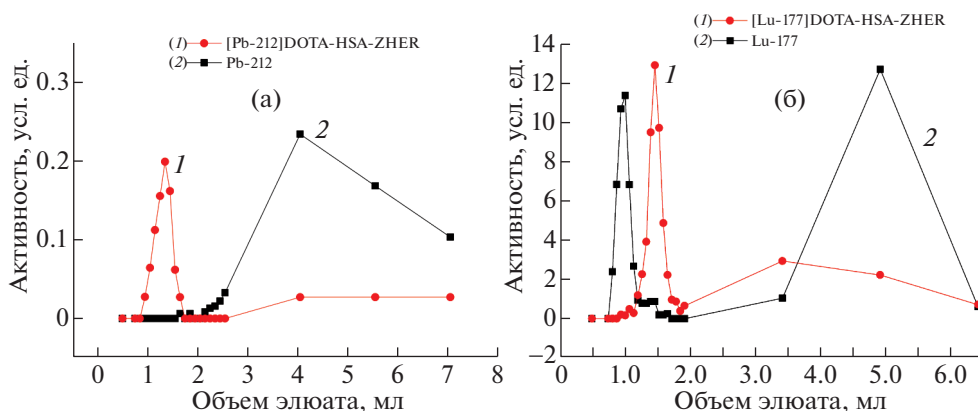


Рис. 3. Результаты эксклюзионной хроматографии на гель-фильтрационной колонке (ГФК) Illustra NAP-5 Column (GE HealthCare) конъюгатов ZHER2-ЧСА-DOTA, меченных радиоактивными изотопами ^{212}Pb (а) и ^{177}Lu (б) (кривые 1). Калибровка ГФК свободными изотопами ^{212}Pb (а) и ^{177}Lu (б) (кривые 2).

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°C в растворе 0.9% NaCl или эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС) (HyClone Laboratories) в течение 1, 2 и 3 ч в случае ^{212}Pb и 1, 2 и 3 сут в случае ^{177}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 cm^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°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 (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}Lu (в форме соли цитрата лютеция в 0.1 М лимонной кислоте с рН, доведенным добавлением концентрированной NaOH до значения 6.0) и ^{212}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}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА

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}Pb]ZHER2–ЧСА–ДОТА

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–ДОТА. Мечение конъюгата ZHER2–ЧСА–ДОТА проводили полученными в настоящей работе ^{177}Lu и ^{212}Pb . Для проведения очистки полученного меченого конъюгата [$^{177}\text{Lu}/^{212}\text{Pb}$]ZHER2–ЧСА–ДОТА 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}Pb]ZHER2–ЧСА–ДОТА белковая фракция полностью отделяется от фракции со свободным ^{212}Pb , которая, в свою очередь, смывается с колонки раствором 0.1 М лимонной кислоты (рис. 3а, кривая 1). В случае с [^{177}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА 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}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}Lu и ^{212}Pb комплекса ZHER2–ЧСА–ДОТА составила 57 ± 10 и 72 ± 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}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА и 80 кБк/мл для [^{212}Pb]ZHER2–ЧСА–ДОТА.

Определение устойчивости комплексов. Исследуемый образец [^{177}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА (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

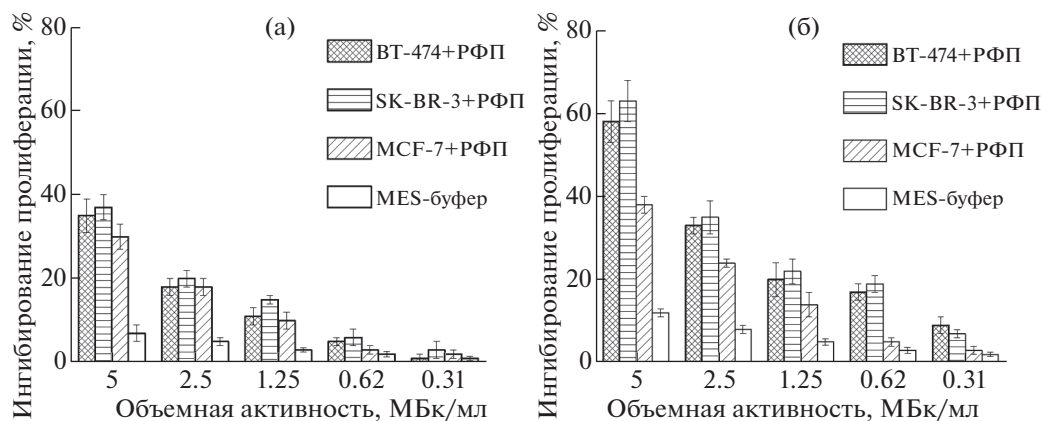


Рис. 4. Цитотоксическая активность адресного радиоактивного конъюгата [^{177}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА в отношении опухолевых клеток РМЖ человека с высоким (BT-474, SK-BR-3) и низким (MCF-7) уровнем экспрессии онкомаркера HER2/neu при воздействии в течение 24 (а) и 72 ч (б). Различия статистически достоверны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

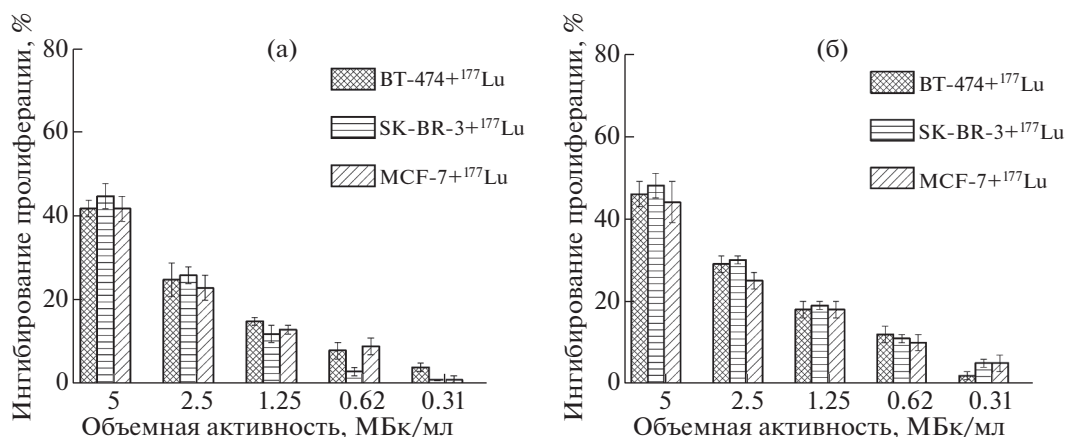


Рис. 5. Цитотоксическая активность ^{177}Lu в виде соли относительно опухолевых клеток РМЖ человека с высоким (BT-474, SK-BR-3) и низким (MCF-7) уровнем экспрессии онкомаркера HER2/neu при воздействии в течение 24 (а) и 72 ч (б). Различия статистически достоверны ($p < 0.05$).

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}Pb]ZHER2–ЧСА–ДОТА (40 кБк, 0.5 мл) добавляли к среде ЭТС при температуре 37°C в отношении 1 : 1. В препарат, содержащий ^{212}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}Lu и ^{212}Pb соответственно. Величины даны в процентах как значение \pm предельное отклонение. Видно, что на протяжении 72 ч устойчивость [^{177}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА сохраняется на уровне $73 \pm 8\%$, а соединение [^{212}Pb]ZHER2–ЧСА–ДОТА 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}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА представлены на рис. 4. При 24-часовой инкубации опухолевых клеток линий BT-474 и SK-BR-3 в присутствии РФП [^{177}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА 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}Lu в виде соли.

При увеличении времени инкубации до 72 ч цитотоксическая активность [^{177}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА 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}Lu в виде соли не зависела от времени инкубации с клетками (рис. 5). Таким образом, показано, что [^{177}Lu]ZHER2–ЧСА–ДОТА 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}Pb]ZHER2–ЧСА–ДОТА представлены на рис. 6. При инкубации клеток линии SK-BR-3 в течение 24 ч при объемных активностях ^{212}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

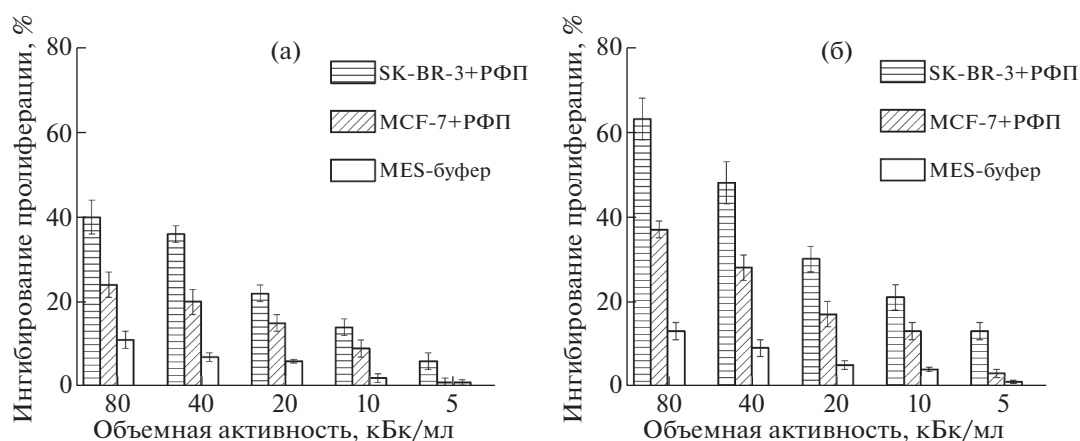


Рис. 6. Цитотоксическая активность адресного радиоактивного конъюгата $[^{212}\text{Pb}]\text{ZHER2-ЧСА-DOTA}$ относительно опухолевых клеток РМЖ человека с высоким (SK-BR-3) и низким (MCF-7) уровнем экспрессии онкомаркера HER2/неу при воздействии в течение 24 (а) и 72 ч (б). Различия статистически достоверны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

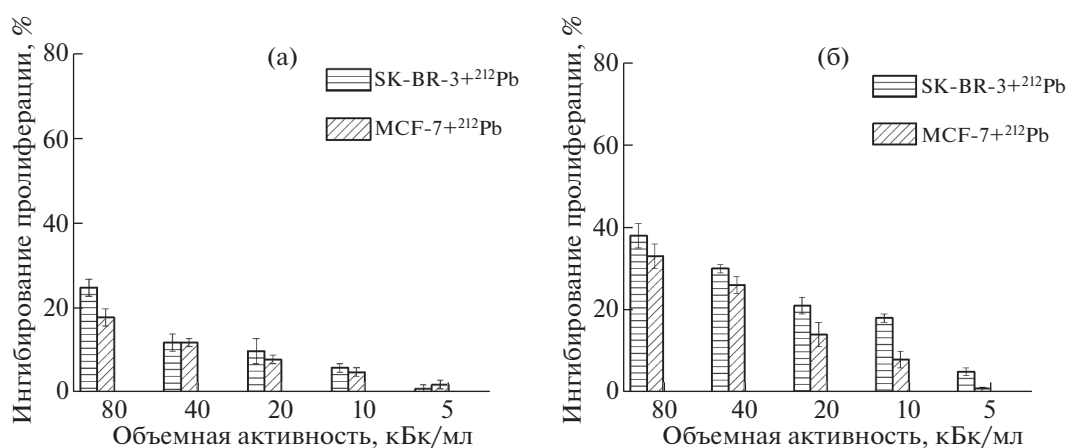


Рис. 7. Цитотоксическая активность ^{212}Pb относительно опухолевых клеток РМЖ человека с высоким (SK-BR-3) и низким (MCF-7) уровнем экспрессии онкомаркера HER2/неу при воздействии в течение 24 (а) и 72 ч (б). Различия статистически достоверны ($p < 0.05$).

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}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}Pb и получены два терапевтических РФП на основе короткоживущих β -эмиттеров ^{177}Lu и ^{212}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.