

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАДИОТРЕЙСЕРА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ АДРЕСНОЙ МОЛЕКУЛЫ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ И ТЕХНЕЦИЯ-99М И ОЦЕНКА ЕГО СПЕЦИФИЧНОСТИ IN VITRO ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОНКОМАРКЕРА HER2

М. С. Ларькина¹, Е. С. Стасюк², О. Д. Брагина³, В. И. Чернов³, Е. В. Подрезова²,
В. В. Боденко¹, М. С. Юсубов², Е. А. Нестеров², М. В. Белоусов¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет,

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

³ Национальный исследовательский институт онкологии,

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

Поступила в редакцию 27.04.2020 г.

Аннотация. Наличие гиперэкспрессии онкомаркера HER2 выявляется на поверхности опухолевых клеток при раке молочной железы, легкого, яичников, желудка, простаты и др. Новый класс адресных молекул неиммуноглобулиновой природы DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Protein), являющихся специфичными к раковоассоциированному антигену HER2, предлагается для радионуклидной диагностики этого антигена. Ранее мы предложили способ модификации адресных молекул белковой природы (DARPIn9_29) с применением хелатирующего агента сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноата (DPAH-NHS) для эффективного связывания ^{99m}Tc. В настоящем исследовании были подобраны оптимальные условия радиосинтеза и предложена двухстадийная методика мечения ^{99m}Tc DPAH-DARPIn9_29. Оптимизация методики мечения заключалась в подборе оптимального времени инкубации и температуры, а также в оптимальном соотношении количеств белка и комплекса ^{99m}Tc(CO)₃. Радиохимический выход и радиохимическую чистоту радиотрейсера оценивали тонкослойной радио-хроматографией на полосках iTLC-бумаги в фосфатно-буферном растворе. При оптимизации методики установлено, что в условиях инкубации (60 мин при 60 °C) на 50 мкг белка необходимо 50 мкл раствора ^{99m}Tc(CO)₃ (с активностью 100-200 МБк). Радиохимический выход радиотрейсера ^{99m}Tc-DPAH-DARPIn9_29 составил более 83 % (изолированный выход более 70 %) при чистоте свыше 96 % после очистки гель-фильтрацией с G25. При этом была доказана высокая стабильность радиотрейсера (чистота более 97 %) после инкубации с 5000-кратным молярным избытком *L*-гистидина в течение 6 часов. Изучение специфичности *in vitro* ^{99m}Tc-DPAH-DARPIn9_29 выполняли на клеточных линиях с различным уровнем экспрессии HER2: SKOV-3 > BT-474. Блокирование рецептора HER2 проводили путем добавления 100-кратного молярного избытка немеченого DARPIn9_29 в половину чашек Петри каждой клеточной линии с последующей инкубацией в течение 60 минут при температуре 37 °C. Установлено, что накопление радиотрейсера пропорционально уровню экспрессии HER2 в клетках, при этом при блокировании рецепторов избытком немеченого белка отмечается значительное снижение связывания радиотрейсера в обеих группах клеток.

Ключевые слова: адресная молекула, хелатирующий агент, сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноат, технеций-99м, радиотрейсер, онкомаркер HER2

Наличие гиперэкспрессии онкомаркера HER2 выявляется на поверхности опухолевых клеток при раке легкого, яичников, желудка, простаты и др. [1-3]. Особое место среди злокачественных новообразований занимает рак молочной железы,

амплификации гена при котором отмечается у 15-20 % больных и ассоциируется с агрессивным течением заболевания, а также с низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости [4-5].

В связи с этим HER2 активно применяется в качестве молекулярной мишени для диагностики и таргетной терапии у пациентов с гиперэкспрессией данного рецептора [5]. При этом новый класс

© Ларькина М. С., Стасюк Е. С., Брагина О. Д., Чернов В. И., Подрезова Е. В., Боденко В. В., Юсубов М. С., Е. А. Нестеров, М. В. Белоусов, 2020

адресных молекул неиммуноглобулиновой природы DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Protein), являющихся специфичными к раковоассоциированному антигену HER2, предлагается для радионуклидной диагностики этого антигена [6-11].

Ранее в рамках государственного контракта № 14.N08.11.0163 от «31» августа 2017 г. ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования радиофармацевтического препарата на основе меченных ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией HER-2/neu» нами был предложен способ получения производного DARPIn9_29 (DPAH-DARPIn9_29) с применением хелатирующего агента сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноата (DPAH-NHS) для прочного связывания ^{99m}Tc [12-15].

Кроме того, нами была показана специфичность связывания радиотрейсера на основе DPAH-DARPIn9_29 и ^{99m}Tc с использованием двух клеточных линий аденокарцином человека с экспрессией (BT-474) и без экспрессии (MCF-7) HER2. Таким образом, данная работа является продолжением работ по разработке отечественного радиотрейсера на основе модифицированной адресной молекулы белковой природы DPAH-DARPIn9_29 и ^{99m}Tc [14].

Целью настоящего исследования явилась оптимизация способа получения радиотрейсера на основе модифицированной адресной молекулы белковой природы DPAH-DARPIn9_29 и ^{99m}Tc и оценка его специфичность *in vitro* для диагностики HER2.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали рекомбинантные адресные молекулы белковой природы с антикириновыми повторами (DARPIn9_29), модифицированные хелатирующим агентом сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноатом (DPAH-NHS) как описано в способе получения (DPAH-DARPIn9_29) [13].

Методика мечення ^{99m}Tc DPAH-DARPIn9_29 и изучение стабильности *in vitro*. Элюат натрия пертехнетата ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) (500 мкл), содержащий 1-2 ГБк, добавляли в набор для приготовления трикарбонильного ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$) «CRS Isolink» (Center for Radiopharmaceutical Science,

Paul Scherrer Institute, Villigen, Швейцария) [16-18], который затем инкубировали при 100 °С в течение 30 минут. После инкубации 50 мкл приготовленного раствора комплекса $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ добавляли к 50 мкг DPAH-DARPIn9_29 в 100 мкл фосфатного буферного раствора (PBS). Смесь инкубировали в течение 60 мин при 60 °С. Полученный комплекс очищали, используя колонки с G25 NAP-5 (GE Healthcare, Швейцария), предварительно уравновешенные элюированием PBS.

Радиохимический выход (РХВ) и радиохимическую чистоту (РХЧ) радиотрейсера оценивали тонкослойной радио-хроматографией (радио-ТСХ) на полосках iTLC-бумаги [19, 20], (iTLC-SG paper, Agilent, США) в PBS. Визуализацию радиохроматограмм проводили с помощью ТСХ-сканера (ELYSIA Raytest. Model: Gamma BGO-V, Detector +miniGita, Германия), для измерения абсолютной радиоактивности использовали дозиметр АТОМЛАВ 500 (Biodex, США).

Меченный ^{99m}Tc DPAH-DARPIn9_29 и коллоид восстановленного гидролизованного ^{99m}Tc оставались в точке нанесения, в то время как $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ мигрировали с фронтом растворителя. Для определения присутствия коллоида восстановленного гидролизованного ^{99m}Tc полоски iTLC элюировали в системе пиридин : уксусная кислота : вода (10 : 3 : 1,5). В этой системе коллоид оставался в месте нанесения, в то время как меченный ^{99m}Tc DPAH-DARPIn9_29, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ мигрировали с фронтом растворителя.

Тест на стабильность проводили путем инкубации очищенного радиотрейсера ^{99m}Tc -DPAH-DARPIn9_29 с 5000-кратным молярным избытком L-гистидина в PBS в течение до 6 часов при комнатной температуре; контрольные образцы инкубировали в PBS. Образцы были проанализированы с помощью радио-iTLC в PBS.

Методика изучения особенности накопления радиотрейсера ^{99m}Tc -DPAH-DARPIn9_29 в культуре клеток злокачественных опухолей. В *in vitro* исследованиях использовались 2 клеточные линии с различным уровнем экспрессии HER2: SKOV-3 (1.6×10^6 рецепторов/клетка) > BT474 (1.2×10^6 рецепторов/клетка). Клетки высевали в чашки Петри диаметром 3,5 см (0,7 млн клеток на чашку) по 10 чашек на каждую линию за 2 дня до исследования до образования монослоя. Далее перед экспериментом среду удаляли, клетки промывали 1 мл PBS. Блокирование клеток выполняли путем добавления немеченого белка DARPIn9_29 (по 500 мкл, 1000 нмоль) в по-

ловину из чашек Петри каждой клеточной линии (в оставшуюся половину чашек по 500 мкл культуральной среды), после инкубации в течение 60 минут при температуре 37 °С во все чашки добавляли испытуемый радиотрейсер (по 500 мкл, 10 нмоль). Клетки инкубировали 1 ч при температуре 37 °С, раствор в каждой чашки собирали в пробирки, клетки промывали 1 мл PBS в те же пробирки и отделяли, добавляя по 500 мкл раствора трипсина (инкубация при температуре 37 °С, 3-5 мин). Затем суспендировали клетки, добавляя по 500 мкл среды, собирали суспензию клеток в пробирки (отбор 20 мкл для подсчета клеток), дополнительно промывали чашки по 1 мл PBS. Радиоактивность каждой фракции клеток измерялась с помощью гамма-спектрометра многоканального CANBERRA (Canberra Industries, Inc., США) и считали связанную клетками радиоактивность в % на 10^6 клеток.

Результаты исследований обрабатывали с помощью программного комплекса Statistica 10.0 и Excel. Достоверность различий оценивалась с использованием t-теста (различия считали достоверными при $p \leq 0.05$). Результаты определения представлены как $\bar{x} \pm S$ ($n=3-5$), где \bar{x} – значение среднего результата, S – стандартное отклонение.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оптимизация методики мечения заключалась в подборе оптимального времени инкубации и температуры, а также в оптимальном соотношении количеств белка и комплекса $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$.

Для DPAH-DARPin9_29 в условиях инкубации 60 мин при 60 °С были подобраны оптимальные соотношения количеств белка и комплекса $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$, что составило 50 мкг белка и 50 мкл раствора $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$. РХВ при этом рассчитан свыше 74 % (табл. 1).

Инкубация DPAH-DARPin9_29 с комплексом $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ в течение 60 мин при 60 °С обеспечивала РХВ более 75 % (табл. 2).

Таблица 1.

Оптимизация методики мечения DPAH-DARPin9_29 с $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ в зависимости от соотношения количеств белка и комплекса $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$

Количество белка*, мкг	РХВ, %	Количество $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ **, мкл	РХВ, %
20	42 ± 3	25	53 ± 2
30	62 ± 0	50	83 ± 3
50	87 ± 2	75	61 ± 2
70	87 ± 1	100	42 ± 1

Примечание: n=3; *условия инкубации – 60 мин при 60 °С, количество раствора $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ (90 МБк) 50 мкл; ** – условия инкубации – 60 мин при 60 °С, количество белка 50 мкг.

Таблица 2.

Оптимизация методики мечения DPAH-DARPin9_29 с $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ в зависимости от времени инкубации (при 60 °С) и от температуры инкубации (при 60 мин инкубации)

Время, мин	РХВ, %	Температура, °С	РХВ, %
20	31 ± 2	10	16 ± 1
30	43 ± 3	25	37 ± 2
40	52 ± 0	40	45 ± 3
50	61 ± 1	50	67 ± 1
60	87 ± 3	60	87 ± 0
80	87 ± 2	80	76 ± 0

Очистка с использованием гель-фильтрационных колонок с G25 обеспечивала РХЧ более 97 %, изолированный выход 72 ± 1 %. Содержание радиоколлоида находилось в пределах 0.6-1.6 %. iTLC-анализ меченного ^{99m}Tc -DPAH-DARPin9_29 после очистки показал один пик (рис. 1).

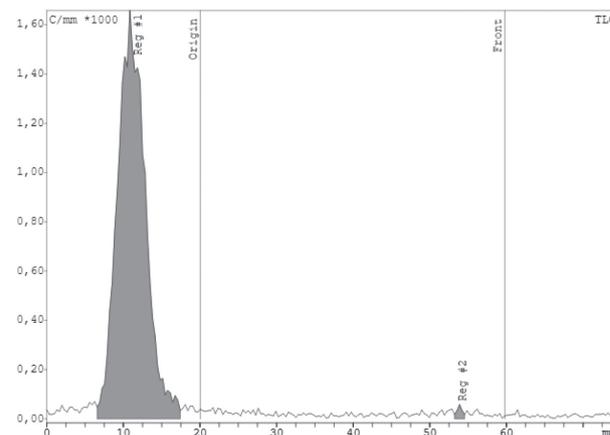


Рис 1. Репрезентативная радиохроматограмма ^{99m}Tc -DPAH-DARPin9_29 после очистки через колонку G25.

Таким образом, DPAH-DARPin9_29 был успешно помечен $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ в подобранных оптимальных условиях радиосинтеза. Специфическая активность составила 1.6 МБк/мкг, что подтверждает оптимальные условия.

Радиотрейсер ^{99m}Tc -DPAH-DARPin9_29 продемонстрировал высокую стабильность (более 97 %) после инкубации с 5000-кратным молярным избытком гистидина в течение 6 часов (табл. 3).

Для изучения специфичности исследуемого радиотрейсера использовались клеточные линии с различным уровнем экспрессии HER2: SKOV-3 > BT-474. На первом этапе выполнялось блокирование рецептора HER2 путем добавления немеченого DARPin9_29 (1000 нмоль) в половину чашек Петри каждой клеточной линии с последующей инкубацией в течение 60 минут при

Результаты определения стабильности $^{99m}\text{Tc-DPAH-DARPin9}_{29}$ *in vitro*

	РХЧ, %					
	1 ч		3 ч		6 ч	
	PBS	5000x гистидин	PBS	5000x гистидин	PBS	5000x гистидин
$^{99m}\text{Tc-DPAH-DARPin9}_{29}$	99 ± 0	99 ± 0	98 ± 0	99 ± 0	98 ± 0	97 ± 1

температуре 37 °С. Затем в каждую чашку добавлялся $^{99m}\text{Tc-DPAH-DARPin9}_{29}$ (10 нмоль) с последующей инкубацией в течение 60 минут при температуре 37 °С. Данные *in vitro* исследований продемонстрировали, что накопление $^{99m}\text{Tc-DPAH-DARPin9}_{29}$ пропорционально уровню экспрессии HER2 в клетках, при этом при блокировании рецепторов избытком немеченого белка отмечается значительное снижение связывания в группе клеток (рис. 2).

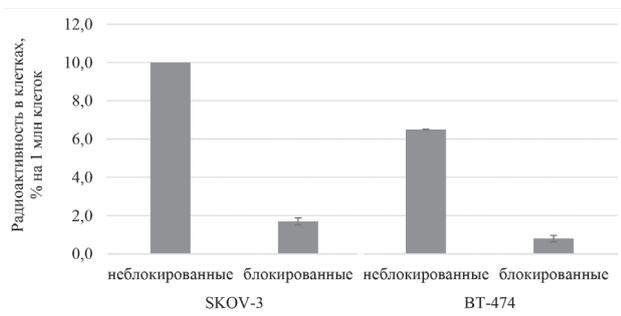


Рис. 2. Изучение специфической активности $^{99m}\text{Tc-DPAH-DARPin9}_{29}$ на клеточных линиях с гиперэкспрессией HER2 (результаты представлены как $\bar{x} \pm S$ ($n=5$)), различия достоверны между SKOV-3 блокированными и неблокированными ($p < 0.0005$); различия достоверны между BT-474 блокированными и неблокированными ($p < 0.0005$); различия достоверны между SKOV-3 (неблокированные) и BT-474 (неблокированные) ($p < 0.0005$)).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были подобраны оптимальные условия радиосинтеза и предложена двухстадийная методика меченая $^{99m}\text{Tc DPAH-DARPin9}_{29}$. При оптимизации методики радиосинтеза при использовании $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ установлено, что в условиях инкубации (60 мин при 60 °С) на 50 мкг белка необходимо 50 мкл раствора $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ (с активностью 100-200 МБк). РХВ радиотрейсера $^{99m}\text{Tc-DPAH-DARPin9}_{29}$ составил более 83 % (изолированный выход более 70 %) при РХЧ свыше 96 % после очистки гель-фильтрацией. При этом была доказана высокая стабильность в присутствии 5000 - кратного мольного избытка *L*-гистидина. Изучение специфичности *in vitro* $^{99m}\text{Tc-DPAH-DARPin9}_{29}$ на клеточных линиях с различным

уровнем экспрессии HER2: SKOV-3 > BT-474 продемонстрировало, что накопление радиотрейсера пропорционально уровню экспрессии HER2 в клетках, при этом при блокировании рецепторов избытком немеченого белка отмечается значительное снижение связывания радиотрейсера в обеих группах клеток.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Государственный контракт от «31» августа 2017 г. № 14.N08.11.0163).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chandra A., Lan S., Zhu J. // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, pp. 20488-20498.
- Полянский О.Л., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. // Биохимия. 2012. Т. 3. № 77. С. 289-311.
- Ibrahim T., Farolfi A., Scarpi E. // Oncology. 2013. Vol. 84. No. 3, pp. 150-157.
- Lower E.E., Glass E., Blau R. // Breast Cancer Res Treat. 2009. Vol. 113. No. 2, pp. 301-306.
- Li M.H., Hou C.L., Wang C. // Pathol Res Pract. 2016. Vol. 212. No. 4, pp. 252-257.
- Plückthun A. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2015. Vol. 55. No. 1, pp. 489-511.
- Zahnd C., Wyler E., Schwenk J.M. // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 369, pp. 1015-1028.
- Epa V.C., Dolezal O., Doughty L. // PLOS ONE. 2013. Vol. 8. No. 3, pp. 1-10.
- Stumpp M.T., Binz H.K., Amstutz P. // Drug Discov. Today. 2008. Vol. 15-16, pp. 695-701.
- Theurillat J.P., Dreier B., Nagy-Davidescu G. // Mod. Pathol. 2010. Vol. 23, pp. 1289-1297.
- Tamascovic R, Simon M., Stefan N. // Methods of Enzymology. 2012. Vol. 503, pp. 101-134.
- Брагина О.Д., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Ларькина М.С. // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18. № 3. С. 125-133.
- Юсубов М.С., Белоусов М.В., Ларькина М.С., Гурьев А.М., Подрезова Е.В., Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Брагина О.Д., Деев С.М., Зельчан Р.В Патент РФ, № 2655965, 2018.
- 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. // Бюллетень сибирской медицины. 2017. Т. 16. № 3. С. 25-33.

15. Чернов В.И., Медведева А.А., Синилкин И.Г. // Бюллетень сибирской медицины. 2018. Т. 1. № 17. С. 220-231.

16. Alberto R. // European Journal of Inorganic Chemistry. 2009. No. 1, pp. 21–31.

17. Alberto R., Pak J.K., Staveren D. // Biopolymers. 2004. Vol. 76. No. 4, pp. 324–333.

18. Alberto R., Ortner K., Wheatley N. // Journal of the American Chemical Society. 2001. Vol. 123. No. 13, pp. 3135–3136.

19. Божко Н.С., Антропов С.Ю., Коростин С.В. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2014. Т. 59. № 4. С. 58-66.

20. Liu, S. Krause W. // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005. Vol. 252, pp. 117–153.

Сибирский государственный медицинский университет

**Ларькина М. С., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтического анализа
E-mail: marialarkina@mail.ru*

*Siberian State Medical University
*Larkina M. S., PhD, Associate Professor, the
Department of Pharmaceutical Analysis
E-mail: marialarkina@mail.ru*

Боденко В. В., студент фармацевтического факультета

E-mail: buuurnbright23@gmail.com

*Bodenko V. V., student of Pharmaceutical
Division*

E-mail: buuurnbright23@gmail.com

Белоусов М. В., доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой фармацевтического анализа

e-mail: mvb63@mail.ru

*Belousov M. V., PhD, DSci., Head of the
Department of Pharmaceutical Analysis*

E-mail: mvb63@mail.ru

Национальный исследовательский Томский политехнический университет

Стасюк Е. С., кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории №31

E-mail: stasyuk@tpu.ru

*Research Tomsk Polytechnic University
Stasyuk E. S., PhD, Researcher, Laboratory №*

31

E-mail: stasyuk@tpu.ru

Подрезова Е. В., аспирант исследовательской школы химических и биомедицинских технологий

E-mail: katerina.podrezova06@mail.ru

*Podrezova E. V., post-graduate student, Research
School of Chemistry & Applied Biomedical Sciences*

E-mail: katerina.podrezova06@mail.ru

Юсубов М. С., доктор химических наук, ведущий научный сотрудник

E-mail: yusubov@mail.ru

*Yusubov M. S., PhD., DSci., Leading Researcher
E-mail: yusubov@mail.ru*

Нестеров Е. А., кандидат технических наук, Заведующий лабораторией №31

E-mail: nesterov_evgeny@mail.ru

*Nesterov E. A., PhD, Head of Laboratory № 31,
E-mail: nesterov_evgeny@mail.ru*

Национальный исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

Брагина О. Д., кандидат медицинских наук, мл. науч. сотрудник

E-mail: rungis@mail.ru

*Cancer Research Institute, Tomsk National
Research Medical Center, Russian Academy of
Science*

Bragina O. D., PhD, Junior Researcher

E-mail: rungis@mail.ru

Ларькина М. С., Стасюк Е. С., Брагина О. Д., Чернов В. И., Подрезова Е. В., Боденко В. В., Юсубов М. С., Е. А. Нестеров, М. В. Белоусов

Чернов В. И., доктор медицинских наук, профессор, зам. директора по научной работе и инновационной деятельности, зав. отделением радионуклидной диагностики

E-mail: chernov@tnimc.ru

Chernov V. I., PhD, DSci., Full Professor, Head of the Nuclear Medicine Department, deputy Director for Research and Innovation

e-mail: chernov@tnimc.ru

PREPARATION OF TECHNETIUM-99M LABELED RADIOTRACER TARGET PROTEIN MOLECULES DERIVATIVE AND *IN VITRO* ASSESSMENT OF ITS SPECIFICITY FOR THE DIAGNOSIS OF HER2

M. S. Larkina¹, E. S. Stasyuk², O. D. Bragina³, V. I. Chernov³, E. V. Podrezova², V. V. Bodenko¹, M. S. Yusubov², E. A. Nesterov², M. V. Belousov¹

¹ Siberian State Medical University

² National Research Tomsk Polytechnic University

³ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science

Abstract. The presence of overexpression of the HER2 tumor marker is detected on the surface of tumor cells in cancer of the breast, lung, ovary, stomach, prostate, etc. A new class of targeted molecules of non-immunoglobulin nature DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Protein), which are specific for the cancer-associated HER2 antigen, is proposed for radionuclide diagnosis of this antigen. Earlier, we proposed a method for preparation the targeted protein molecule DARPIn_{9_29} derivate (DPAH-DARPIn_{9_29}) using the chelating agent succinimid-1-yl 6-(bis(pyridin-2-ylmethyl) amino)hexanoate for efficient binding of ^{99m}Tc. In this study, the optimal conditions for radiosynthesis were selected and a two-stage ^{99m}Tc labeling method DPAH-DARPIn_{9_29} was proposed. The optimization of the labeling technique consisted in the selection of the optimal incubation time and temperature, as well as in the optimal ratio of protein to complex ^{99m}Tc(CO)₃. Radiochemical yield and purity were measured using radio-iTLC in PBS. It was found that, under incubation conditions (60 min at 60 °C), 50 µl of a ^{99m}Tc(CO)₃ solution (with an activity of 100-200 MBq) is necessary for 50 µg of protein. The radiochemical yield of radiotracer ^{99m}Tc-DPAH-DARPIn_{9_29} was over 83 % (isolated yield about 70 %), the radiochemical purity after gel-filtration purification was over 96 %. The stability of ^{99m}Tc-DPAH-DARPIn_{9_29} has been proven in accordance with a 5,000-fold mol excess of *L*-histidine. Binding specificity of ^{99m}Tc-labeled DPAH-DARPIn_{9_29} to HER2 was evaluated using HER2-expressing SKOV3 and BT474 cells. To saturate HER2 receptors, a 100-fold excess of non-labeled DARPIn_{9_29} (100-fold mol excess) was added to the control group of cells. In vitro studies showed that the accumulation of ^{99m}Tc-DPAH-DARPIn_{9_29} was directly proportional to the level of HER2 expression in cells (SKOV-3 > BT-474), while blocking the receptors with an excess of unlabeled protein showed a significant reduction in binding in the group of cells.

Keywords: target molecule, chelating agent, succinimid-1-yl 6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino) hexanoate, technetium-99m, radiotracer, HER2

REFERENCES

1. Chandra A., Lan S., Zhu J., J. Biol. Chem., 2013, Vol. 288, pp. 20488-20498. DOI: 10.1074/jbc.m112.447250
2. Polyansky O. L., Lebedenko E. N., Deev C. M., Biochemistry, 2012, Vol. 3, No. 77, C. 289-311.
3. Ibrahim T., Farolfi A., Scarpì E., Oncology, 2013, Vol. 84, No. 3, pp. 150-157. DOI: 10.1159/000345795
4. Lower E.E., Glass E., Blau R., Breast Cancer Res Treat, 2009, Vol. 113, No. 2, pp. 301-306. 5.

- Li M.H., Hou C.L., Wang C., Pathol Res Pract., 2016, Vol. 212, No. 4, pp. 252-257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.11.019>
6. Plückthun A., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2015, Vol. 55, No. 1, pp. 489-511. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654
7. Zahnd C., Wyler E., Schwenk J.M., J. Mol Biol., 2007, Vol. 369, pp. 1015-1028. DOI: 10.2210/pdb2jab/pdb
8. Epa V.C., Dolezal O., Doughty L., PLOS ONE, 2013, Vol. 8, No. 3, pp. 1-10.

9. Stumpp M.T., Binz H.K., Amstutz P., Drug Discov. Today, 2008, Vol. 15-16, pp. 695-701. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.04.013
10. Theurillat J.P., Dreier B., Nagy-Davidescu G., Mod. Pathol., 2010, Vol. 23, pp. 1289-1297. DOI: 10.1038/modpathol.2010.103
11. Tamascovic R, Simon M., Stefan N., Methods of Enzymology, 2012, Vol. 503, pp. 101-134. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654
12. Bragina O.D., Chernov V.I., Zeltchan R.V., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Larkina M.S., Bulletin of Siberian Medicine, 2019, Vol. 18, No. 3, pp. 125-133.
13. Yusubov M.S., Belousov M.V., Larkina M.S., Guryev A.M., Podrezova E.V., Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Chernov V.I., Bragina O.D., Deev S.M., Zelchan R.V. Patent RF, no. 2655965, 2018.
14. Bragina O.D., Larkina M.S., Stasyuk E.S., Chernov V.I., Yusubov M.S., Skuridin V.S., Deev S.M., Zelchan R.V., Buldakov M. A., Podrezova E.V., Belousov M.V., Bulletin of Siberian Medicine, 2017, Vol. 16, No. 3, pp. 25-33.
15. Chernov V.I., Medvedeva A.A., Sinilkin I.G., Bulletin of Siberian medicine, 2018, Vol. 1, No. 17, P. 220-231.
16. Alberto R., European Journal of Inorganic Chemistry, 2009, No. 1, pp. 21-31. DOI: 10.1002/ejic.200800909
17. Alberto R., Pak J.K., Staveren D., Biopolymers, 2004, Vol. 76, No. 4, pp. 324-333. DOI: 10.1002/bip.20129
18. Alberto R., Ortner K., Wheatley N., Journal of the American Chemical Society, 2001, Vol. 123, No. 13, pp. 3135-3136. DOI: 10.1021/ja003932b
19. Bozhko N.S., Antropov S.Yu., Korostin S.V., Medical radiology and radiation safety, 2014, Vol. 59, No. 4, pp. 58-66.
20. Liu, S. Krause W., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, Vol. 252, pp. 117-153.