

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Федотова Анжелика Олеговна**

**Комплексы  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}(\text{Eu}^{3+})$  и  $\text{Vi}^{3+}$  с конъюгатами коротких аналогов соматостатина для диагностики и терапии онкологических заболеваний**

1.4.13 – Радиохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории радиофармацевтической химии на кафедре радиохимии Химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель – Егорова Байирта Владимировна,**  
кандидат химических наук

**Официальные оппоненты – Ермолаев Станислав Викторович,**  
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Института ядерных исследований РАН

**Красикова Раиса Николаевна,**  
кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией радиохимии Института мозга человека имени Н.П. Бехтеревой РАН

**Розенкранц Андрей Александрович,**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена РАН

Защита диссертации состоится «15» ноября 2023 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета МГУ.014.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы 1 стр.10, ауд.308.

E-mail: [severin@radio.chem.msu.ru](mailto:severin@radio.chem.msu.ru) (А.В. Северин, ученый секретарь диссертационного совета МГУ.014.6); [angie.chem.msu@gmail.com](mailto:angie.chem.msu@gmail.com) (соискатель)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.6/2678>

Автореферат разослан «\_\_» октября 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



А.В. Северин

## Общая характеристика работы

### Актуальность исследования

Ядерная медицина – направление современной медицины, использующее радиоактивные вещества для диагностики и терапии онкологических заболеваний. В ее основе лежит использование радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП), способных создать дозу ионизирующего излучения в очаге поражения при минимальном воздействии на здоровые ткани. В роли источника излучения в РФЛП применяются один или несколько радионуклидов, в то время как направленная доставка достигается благодаря использованию векторных молекул (антител, пептидов и пр.), способных избирательно взаимодействовать с раковыми клетками и содержащих радионуклиды в связанном виде.

Среди онкологических заболеваний выделяют класс нейроэндокринных опухолей, которые характеризуются повышенной экспрессией рецепторов гормона соматостатина (SST). С момента открытия данного пептидного гормона, в силу его крайне короткого времени жизни в крови, по сей день активно ведутся разработки его аналогов, обладающие большим временем действия. На сегодняшний день в мировой клинической практике успешно применяется циклический октапептид октреотид и его производные DOTATOC и DOTATATE, способные образовывать высокоустойчивые комплексы с различными радионуклидами, в том числе медицинскими:  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  и др.

Установлено, что критически важным для сохранения биологической активности (сродства к рецепторам) таких пептидных аналогов является наличие в их структуре аминокислотной последовательности Phe—Trp—Lys—Thr. Причем, с точки зрения вторичной структуры белковых молекул, данный фрагмент должен образовывать  $\beta$ -поворот ( $\beta$ -петлю). В связи с этим в области исследований соматостатиновых аналогов появилась тенденция к уменьшению аминокислотной цепи с сохранением вышеупомянутой конформации в том числе за счет циклической структуры пептида. Сами по себе, короткие пептиды меньше подвержены протеолизу, дольше присутствуют в кровеносном русле, а также более удобны с точки зрения их синтеза, что делает их весьма привлекательным компонентом для РФЛП. Однако в настоящее время в литературе нет данных об исследованиях ультракоротких тетра- и пентапептидов линейного типа в качестве аналогов соматостатина.

Таким образом, **целью** данной работы является определение условий получения и перспективности применения комплексов конъюгатов коротких пептидов с радионуклидами  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{161}\text{Tb}$  ( $^{152}\text{Eu}$ ),  $^{207}\text{Bi}$  в качестве компонентов радиофармпрепаратов. Радионуклиды  $^{152}\text{Eu}$  и  $^{207}\text{Bi}$  использовались как долгоживущие аналоги медицинских радионуклидов тербия и альфа-излучающих изотопов висмута-212,213. Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Определение оптимальных условий синтеза комплексов пептидных конъюгатов DOTA-P и L-P1 (рис.1): температуры, концентрации лиганда, pH, продолжительности синтеза;

2. Проверка устойчивости меченых комплексов в сыворотке, изотоническом растворе, а также в присутствии биологически значимых катионов;
3. Теоретическое и экспериментальное определение сродства исследуемых конъюгатов к целевым рецепторам;
4. Анализ вторичной структуры пептидных конъюгатов и их комплексов с металлами;
5. Исследование поведения меченых конъюгатов *in vivo*.

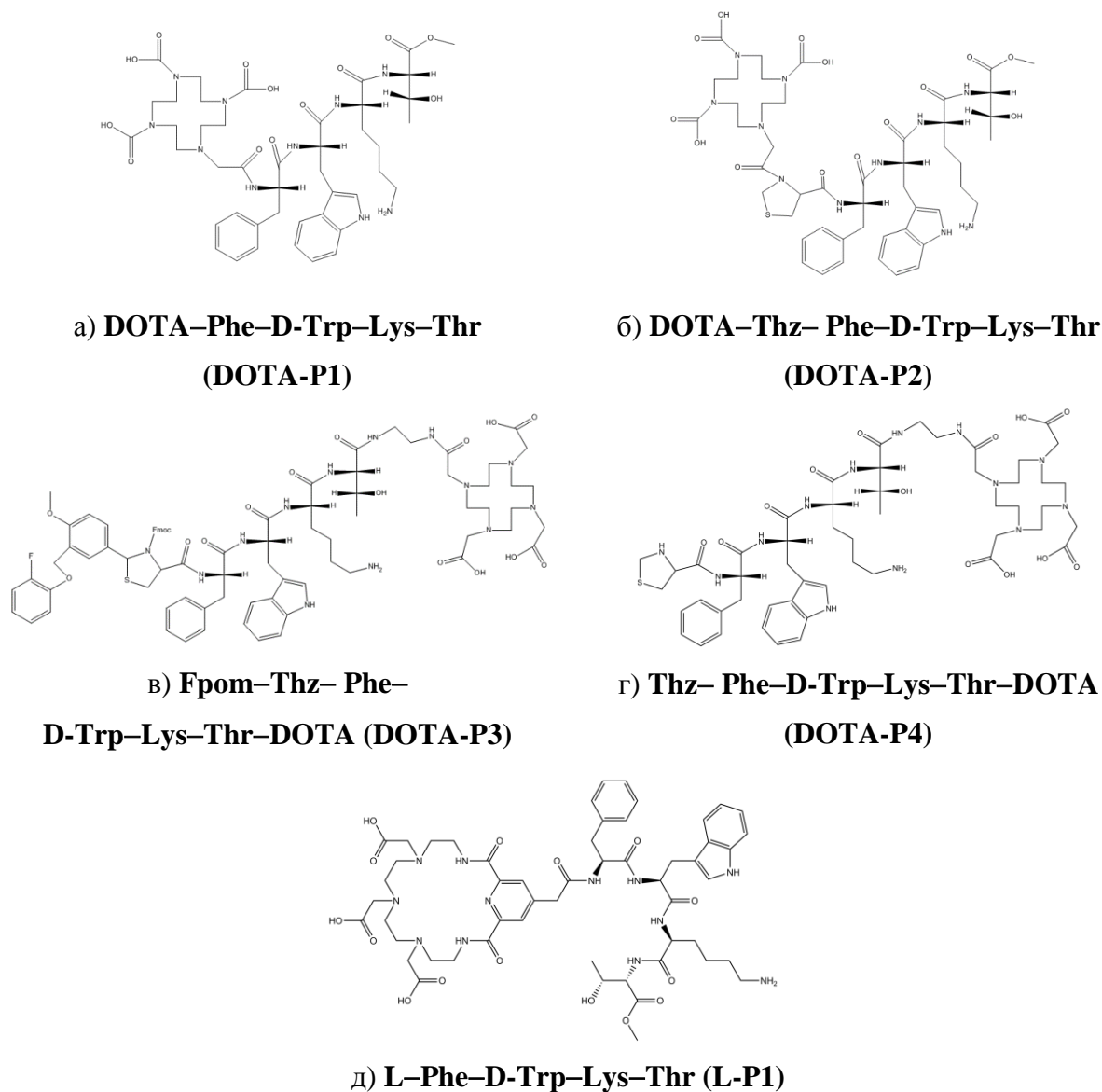


Рис.1. Структурные формулы исследуемых конъюгатов.

### Научная новизна

1. Впервые получены данные об устойчивости комплексов исследуемых пептидных конъюгатов с радионуклидами  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{207}\text{Bi}$  в условиях *in vitro* и *in vivo*, и предложен конъюгат Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA для применения в качестве биологического вектора в составе радиофармпрепарата.

2. Впервые получены данные о сродстве исследуемых пептидных конъюгатов к рецепторам соматостатина на поверхности клеток нейробластомы человека.

3. Впервые изучен тип вторичной структуры исследуемых пептидных конъюгатов.

### **Практическая и теоретическая значимость работы**

1. Результаты данной диссертационной работы могут быть применены для разработки диагностических и терапевтических радиофармпрепаратов на основе конъюгатов ультракоротких пептидов, меченных медицинскими радионуклидами редкоземельных элементов (РЗЭ) и висмута.

2. Впервые установлены оптимальные условия синтеза комплексов исследуемых пептидных конъюгатов с радионуклидами  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{207}\text{Bi}$ .

3. Данные о сродстве исследуемых конъюгатов к рецепторам соматостатина, влиянии расположения хелатирующей группы по отношению к пептидной последовательности на связывание радионуклида получены впервые и могут использоваться при создании и разработке новых более эффективных пептидных конъюгатов для ядерной медицины.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Катионы  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$  образуют высокоустойчивые комплексы с конъюгатами DOTA-P (P=P1, P2, P3, P4) в различных средах биологического значения, а комплекс  $[\text{}^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$  устойчив в условиях и *in vitro*, и *in vivo*;

2. Перенос хелатора от N-конца к C-концу аминокислотной цепи повышает стерическую доступность хелатора для катиона в растворе. Конъюгаты коротких пептидов с положением хелатора у C-конца аминокислотной цепи демонстрируют сродство к рецепторам соматостатина на поверхности клеток IMR-32, при этом добавление дополнительного органического фрагмента приводит к увеличению неспецифического связывания.

3. Конъюгат DOTA-P4 обладает типом вторичной структуры  $\beta$ -поворот ( $\beta$ -петля), который сохраняется при образовании комплекса с металлом и необходим для биологической активности соматостатиновых аналогов.

**Личный вклад автора** охватывал критический обзор литературных данных, подбор методик анализа методами тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), проведение экспериментов по определению оптимальных параметров синтеза комплексов, исследование устойчивости комплексов *in vitro*, проведение всех теоретических расчетов методами молекулярной динамики и молекулярного докинга, проведение экспериментов с культурами клеток, участие в исследовании и непосредственном анализе конъюгатов и комплексов методом спектроскопии кругового дихроизма, участие в экспериментах на лабораторных животных, участие в работах по разделению и выделению радионуклидов тербия из облученной мишени, самостоятельную обработку, обобщение, интерпретацию и систематизацию результатов, написание публикаций по теме работы.

**Методология и методы исследования.** В работе использовались современные инструментальные методы анализа: гамма-спектрометрия, жидкостная сцинтилляционная спектроскопия, масс-спектрометрия, спектроскопия кругового дихроизма, высокоэффективная

жидкостная хроматография, цифровая автордиография. Часть исследования выполнялась с помощью теоретических (расчетных) методов: гомологическое моделирование, метод функционала плотности, метод молекулярной динамики, молекулярный докинг.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.13 – Радиохимия по области исследований: методы выделения, разделения и очистки радиоактивных элементов и изотопов; получение и идентификация меченных соединений; методы радиохимического анализа; автордиография; химические аспекты использования радионуклидов в биологии и медицине.

**Степень достоверности.** Достоверность определяется использованием современных расчетных и инструментальных методов исследования, сходимостью результатов измерений и воспроизводимостью полученных результатов.

**Апробация результатов.** Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, Россия, 2022, устный доклад); X Российская конференция с международным участием «Радиохимия-2022» (Санкт-Петербург, Россия, 2022, устный доклад); IV Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтические препаратов Радиофарма-2021» (Переславль-Залесский, Россия, 2021, устный доклад), XI International Conference on Chemistry for Young Scientists “Mendeleev 2019” (Санкт-Петербург, Россия, 2019, устный доклад), III Международная научно-практическая конференция "Радиофарма-2019" (Москва, 2019, стендовый доклад), International Symposium on Metal Complexes (ISMEC) 2019 (Дебрецен, Венгрия, 2019, стендовый доклад), V International Scientific Conference «Advances in synthesis and complexing» (Москва, Россия, 2019, устный доклад), The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research (Москва, Россия, 2019, устный доклад), IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018» (Санкт-Петербург, Россия, 2018, стендовый доклад).

**Публикации.** Основные результаты работы отражены в 14 публикациях, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI), 1 патент и 9 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях.

**Структура и объем работы.** Научно-квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения в шести главах, выводов, списка литературы и приложений. Список цитируемой литературы включает 182 наименования. Работа изложена на 119 страницах, содержит 62 рисунка и 19 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во введении кратко обоснована актуальность темы работы, сформулированы цель и задачи исследования, указана научная новизна и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы (глава 1) рассмотрены соматостатин и его различные пептидные и непептидные аналоги, характеристики основных хелаторов, а также комплексы медицинских радионуклидов РЗЭ и висмута с аналогами соматостатина, нашедшими применение в радиофармацевтической практике.

В экспериментальной части (глава 2) описаны используемые в работе материалы, в том числе конъюгаты DOTA-P (P=P1,P2,P3,P4) и L-P1 (синтезированы в НИЦ «Курчатовский институт» - ИРЕА в лаборатории Д.С. Хачатряна), инструментальные и расчетные методы, условия мечения и анализа комплексов исследуемых конъюгатов с радионуклидами методами ТСХ и ВЭЖХ, методы определения устойчивости комплексов *in vitro*, методы анализа сродства исследуемых конъюгатов к рецепторам соматостатина, в том числе и расчетные, условия проведения экспериментов *in vivo*, а также способ получения радионуклида  $^{161}\text{Tb}$  и его выделения из мишени оксида диспрозия природного изотопного состава.

Обсуждение результатов разделено на 6 глав, посвященных определению условий образования меченных комплексов (глава 3), анализу устойчивости комплексов *in vitro* (глава 4), исследованию сродства пептидных конъюгатов к рецепторам соматостатина (глава 5), анализу вторичной структуры пептидных конъюгатов (глава 6), устойчивости и анализу распределения комплексов в условиях *in vivo* (глава 7), сравнению комплексов  $^{152}\text{Eu}[\text{Eu-DOTA-P4}]$  и  $^{161}\text{Tb}[\text{Tb-DOTA-P4}]$  (глава 8).

### 1. Определение оптимальных условий образования меченных комплексов

Стандартными методами определения радиохимической чистоты в рамках контроля качества РФЛП являются тонкослойная (ТСХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для мечения пептидных конъюгатов нами были выбраны катионы радионуклидов, образующие наиболее устойчивые комплексы с хелатором DOTA:  $^{44}\text{Sc}^{3+}$ ,  $^{90}\text{Y}^{3+}$ ,  $^{152}\text{Eu}^{3+}$ ,  $^{207}\text{Bi}^{3+}$ . Радиус соответствующих ионов и константа гидролиза по первой ступени для всех радионуклидов приведены в таблице 1. Радионуклиды  $^{152}\text{Eu}$  ( $T_{1/2} = 13,5$  лет) и  $^{207}\text{Bi}$  ( $T_{1/2} = 31,5$  лет) были использованы нами в качестве долгоживущих аналогов медицинских радионуклидов РЗЭ ( $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ) и  $^{212,213}\text{Bi}$  соответственно.

Таблица 1. Радиусы исследуемых катионов и константы гидролиза по первой ступени.

$\text{M}^{3+}$	$R_i$ (КЧ 8), Å [1]	$\lg \beta_{\text{M-он}}$ [2]
$\text{Sc}^{3+}$	0,87	-4,3
$\text{Y}^{3+}$	1,02	-7,7
$\text{Eu}^{3+}$	1,07	-7,9
$\text{Bi}^{3+}$	1,17	-1,1

#### Подбор условий ТСХ

Синтезированный комплекс  $[\text{M}]\text{M-DOTA-P}$  ( $c=1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 4-6,  $90^\circ\text{C}$ ) и раствор свободного катиона с тем же значением pH использовали при подборе условий для проведения

тонкослойной хроматографии. Полученные хроматограммы экспонировали с помощью автордиографии. По результатам подбора условий были подобраны системы для анализа всех исследуемых комплексов. В большинстве случаев наиболее подходящими оказались системы, в которых в качестве подвижной фазы выступает элюент, проявляющий хелатирующие свойства:  $\text{H}_3\text{Cit}/\text{Na}_3\text{Cit}$  и  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ , в таких системах меченый комплекс остается на старте, а свободный катион хелатируется подвижной фазой и движется с фронтом.

### Мечение DOTA-P1

Пептидные радиофармацевтические препараты, конъюгированные с  $\text{H}_4\text{DOTA}$ , образуют комплексы с радиоактивными изотопами только при повышенных температурах до  $100^\circ\text{C}$ . Несмотря на высокие константы комплексообразования DOTA со многими катионами, кинетика хелатирования в нормальных условиях очень медленная, что неприемлемо для короткоживущих радионуклидов. В связи с этим, в работе были протестированы температуры синтеза  $37^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$ ,  $75^\circ\text{C}$  и  $90^\circ\text{C}$ , при этом использовались фиксированные значения pH и концентрации пептидов.

При нагревании до  $37^\circ\text{C}$  степень мечения DOTA-P1 (Рис. 1а) для всех катионов составляла около 20% даже в течение 60 минут. Повышение температуры синтеза значительно сокращает время, необходимое для образования комплекса с выходом 93-95%: от 20 до 30 минут при  $90^\circ\text{C}$  и от 60 до 120 минут при  $60^\circ\text{C}$  (Рис.2). Идентичность меченых соединений при разных температурах подтверждается совпадением значений  $R_f$  и формы пятна на автордиограммах.

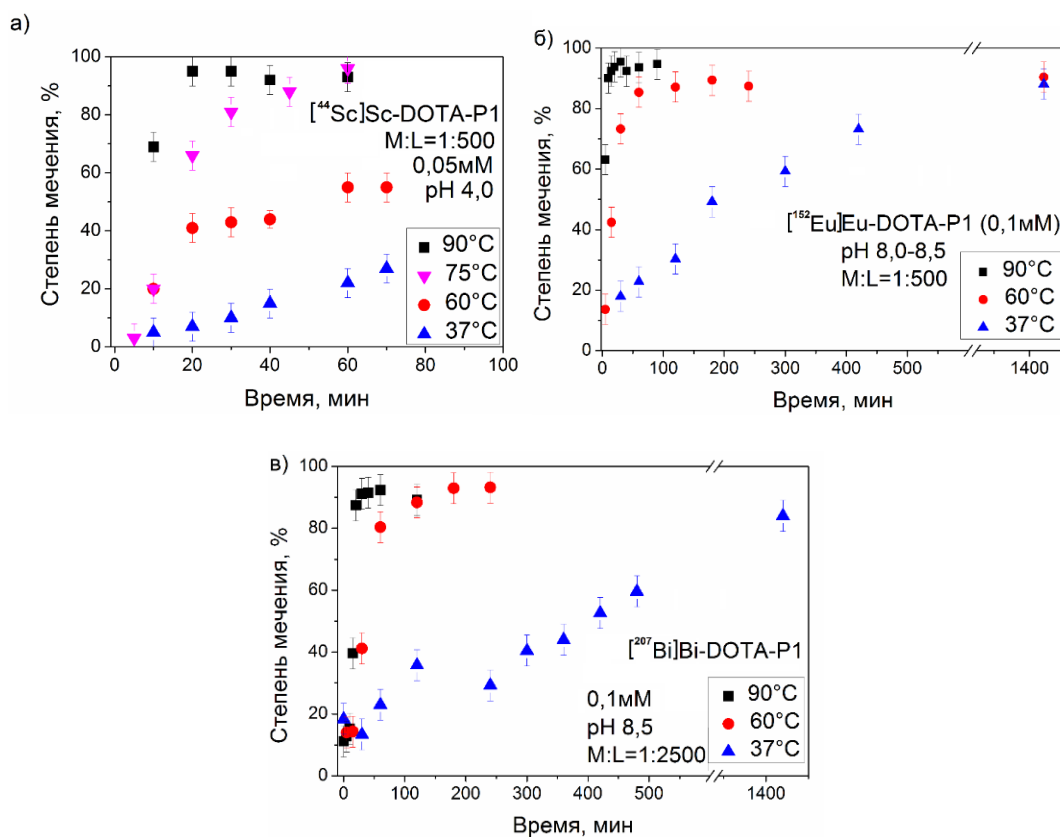


Рис.2. Зависимость степени мечения DOTA-P1 от времени при различных температурах катионами: а)  $^{44}\text{Sc}$ , б)  $^{152}\text{Eu}$  в)  $^{207}\text{Bi}$ .



В радиофармацевтической практике важно получить соединение с наивысшей удельной активностью, поэтому необходимо определить самое высокое соотношение M:L, которое будет использоваться для достаточного комплексообразования. Эффективность мечения для различных соотношений M:DOTA-P1 для катионов  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{152}\text{Eu}$  и  $^{207}\text{Bi}$  была определена после 1-часовой выдержки при  $90^\circ\text{C}$  (Таблица 2). Можно сделать вывод, что концентрация лиганда 0,1 мМ достаточна для 93-95% хелатирования  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ , в то время как для  $\text{Sc}^{3+}$  высокий выход мечения достигается уже при концентрации конъюгата 0,05 мМ.

Таблица 2. Степень мечения DOTA-P1 при различных концентрациях DOTA-P1 катионами  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{152}\text{Eu}$  и  $^{207}\text{Bi}$ .

c(DOTA-P1)	Sc:DOTA-P1	Степень мечения, %	Eu:DOTA-P1	Степень мечения, %	Bi:DOTA-P1	Степень мечения, %
0,03 мМ	1:300	84±4,0	1:150	4,8±0,5	1:750	87,1±4,0
0,1 мМ	1:1000	98±4,0	1:500	94,7±4,0	1:2500	93,1±4,0
0,2 мМ	1:2000	96±4,0	1:1000	95,3±4,2	-	-
0,3 мМ	-	-	1:1500	96,5±4,5	1:7500	92,6±4,0

Поскольку протонирование лиганда, а также гидролиз катионов зависят от pH, важно также найти оптимальное значение pH для процесса комплексообразования. Так было показано, что при pH от 2,3 до 2,6 степень мечения DOTA-P1 составляет не более 17% для  $\text{Bi}^{3+}$  и 11% для  $\text{Eu}^{3+}$ , а повышение pH увеличивает максимальный выход мечения (рис. 3в, г). Интересно, что для скандия самый высокий выход реакции мечения был получен при pH 4,0-5,0 (рис. 3а). Увеличение pH раствора до 6 вызывает быстрый рост степени мечения в начале реакции из-за связывания частично депротонированной DOTA, а затем доля связанного катиона уменьшается. Такая чувствительность к pH может быть связана с гидролизом  $\text{Sc}^{3+}$ . Будучи наименьшим из РЗЭ $^{3+}$ , он является самым жестким среди них и демонстрирует гораздо более высокие константы гидролиза, чем другие, даже  $\text{Y}^{3+}$  (Таблица 1). Отсутствие такой же тенденции для  $\text{Bi}^{3+}$  может быть следствием более высокой константы стабильности комплекса Bi-DOTA по сравнению с Sc-DOTA ( $\log K_{\text{Bi-DOTA}} = 30$ ,  $\log K_{\text{Sc-DOTA}} = 27$ ). Для иттрия наблюдается отсутствие какого-либо влияния pH раствора на процесс мечения: высокий выход реакции достигается уже в течение 10 мин как при pH 3,8, так и при pH 8,2 (рис.3б).

### **Мечение DOTA-P2**

DOTA-P1 и DOTA-P2 различаются наличием аминокислоты тиазолидина (Thz) между хелатором и последовательностью Phe-D-Trp-Lys-Thr (Рис. 1а,б). В первую очередь для DOTA-P2 мы использовали уже подобранные условия для DOTA-P1, однако они оказались подходящими только для  $^{44}\text{Sc}^{3+}$  и  $^{90}\text{Y}^{3+}$ , при этом наблюдалась более медленная кинетика связывания по сравнению с DOTA-P1: наибольшая степень мечения составила 97% при  $T=90^\circ\text{C}$  в течение 20 минут при концентрации 0,2 мМ.

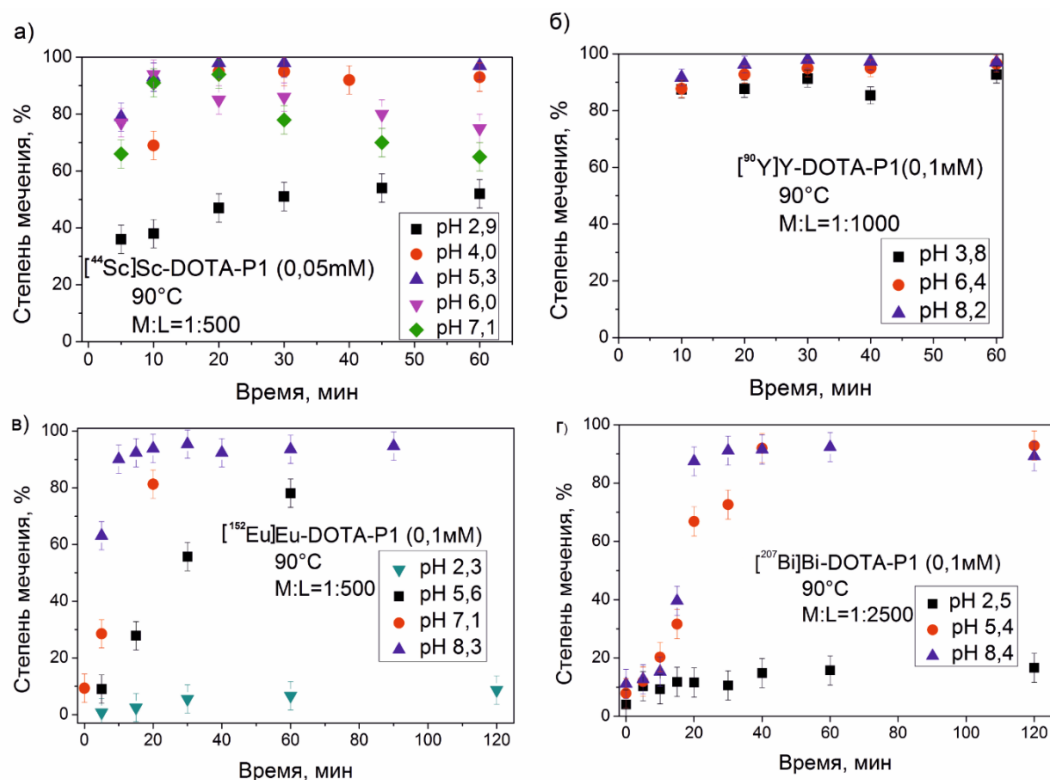


Рис.3. Зависимость степени мечения DOTA-P1 от времени при различном значении pH раствора катионами: а)  $^{44}\text{Sc}$ , б)  $^{90}\text{Y}$ , в)  $^{152}\text{Eu}$  в)  $^{207}\text{Bi}$ .

Иная ситуация наблюдалась с катионами  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ . Оказалось, что подобранные условия мечения для комплекса DOTA-P1 не подходят для DOTA-P2. Мечение DOTA-P2 катионами  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$  протекает не только медленнее, но и при значениях pH 8,0-8,4 конкурирует с гидролизом как катионов, так и самих пептидов. Более того, повышение температуры, по-видимому, в разной степени усиливает процессы комплексообразования и гидролиза (Рис. 4а). В результате мы наблюдали монотонное снижение эффективности мечения при повышении температуры реакции.

Помимо гидролиза катионов, длительная инкубация DOTA-P2 в щелочной среде по-видимому вносит большой вклад и в гидролиз пептидных связей, что приводит к разрушению самих пептидов и что было подтверждено результатами масс-спектрометрии. Принимая во внимание единственное различие между DOTA-P1 и DOTA-P2, можно сделать вывод, что вставка Thz-остатка между тетрапептидной последовательностью и хелатирующим агентом вызывает появление там лабильных связей, а также препятствует хелатированию. Наилучшие результаты для DOTA-P2 были получены при pH 8 в течение нескольких суток (Рис. 4б).

Таким образом, для катионов  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$  единственным возможным способом достижения степени мечения DOTA-P2 от 95% до 98% является синтез при  $T = 37^\circ\text{C}$  в течение 4 суток (Рис. 4б). Очевидно, что такой способ не применим в радиофармацевтической практике. По результатам мечения конъюгатов DOTA-P1 и DOTA-P2 мы предположили, что стерические затруднения, связанные с добавлением Thz, критически влияют на мечение DOTA-P2 более

крупными катионами, такими как  $\text{Eu}^{3+}$  (CN8,  $R_i = 1,07 \text{ \AA}$ ) и  $\text{Bi}^{3+}$  (CN8,  $R_i = 1,17 \text{ \AA}$ ), в то время как процесс связывания меньших  $\text{Sc}^{3+}$  (CN8,  $R_i = 0,87 \text{ \AA}$ ) и  $\text{Y}^{3+}$  (CN8,  $R_i = 1,02 \text{ \AA}$ ) только замедляется.

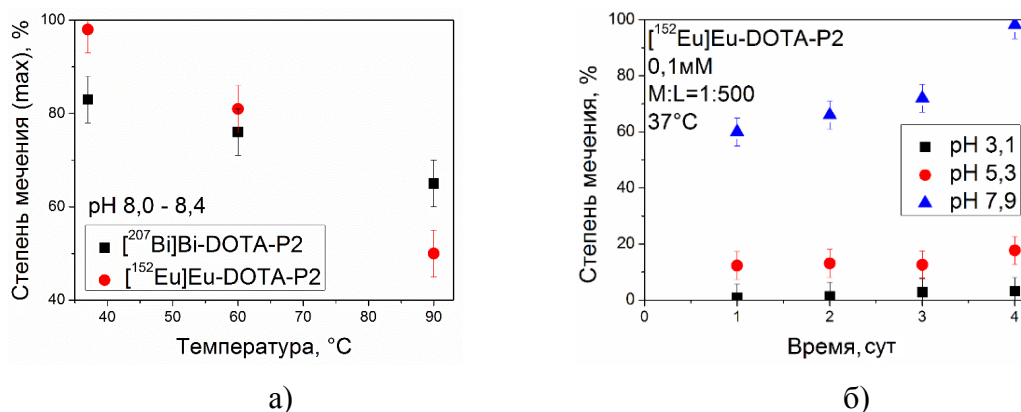


Рис.4. а) Максимальная степень мечения DOTA-P2 катионами  $^{207}\text{Bi}^{3+}$  и  $^{152}\text{Eu}^{3+}$  при разных температурах: 90°C (30 мин), 60°C (2ч) и 37°C (4 сут); б) зависимость степени мечения DOTA-P2 катионами  $^{152}\text{Eu}^{3+}$  от времени при различных значениях pH раствора.

### Мечение L-P1

Ранее бензоазакраун-лиганд L (Рис.1д) исследовался в нашей лаборатории и зарекомендовал себя как хелатор, образующий устойчивые комплексы с катионами висмута уже при комнатной температуре [3]. В данной работе при исследовании конъюгата L-P1 нас интересовало, сохранится ли данная особенность после конъюгации лиганда и пептида, что было бы преимуществом не только перед использованием лиганда DOTA, но и после неудачных экспериментов с DOTA-P2 при высоких температурах. По результатам мечения конъюгат L-P1 действительно не требует повышенных температур для комплексообразования по сравнению с DOTA-P1 и даже при pH 3 достигается степень мечения 80%, что было подтверждено результатами ТСХ (Рис.5) и ВЭЖХ.

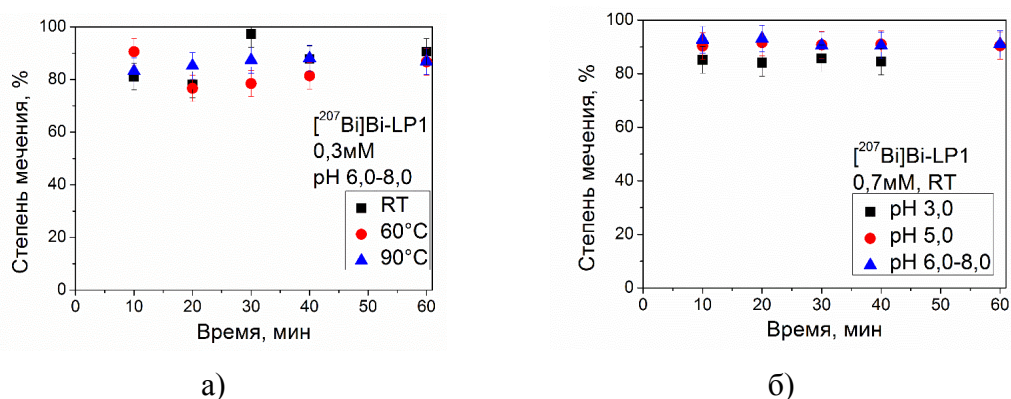


Рис. 5. Зависимость степени мечения L-P1 катионами  $^{207}\text{Bi}$  от времени при различных: а) температурах, б) pH раствора.

### Мечение DOTA-P4

Для того, чтобы подтвердить гипотезу о стерической затрудненности DOTA в DOTA-P2 по сравнению с DOTA-P1 было принято решение видоизменить структуру пептидных конъюгатов. Новый конъюгат DOTA-P4 (Рис.1г) отличался от DOTA-P2 положением хелатора DOTA: в DOTA-P4 он связан с пептидной цепью с противоположного конца (С-конца), а именно

с аминокислотой Thr. Поскольку результаты наших предварительных экспериментов с DOTA-P1 и DOTA-P2 показали, что 90°C является оптимальной температурой для мечения короткоживущими радионуклидами, именно она была выбрана для проведения реакций комплексообразования. Для определения оптимальных значений pH и концентрации пептидов в первую очередь тестировались условия, подобранные для DOTA-P1 и DOTA-P2.

Мечение DOTA-P4 «небольшими» катионами  $^{44}\text{Sc}^{3+}$  и  $^{90}\text{Y}^{3+}$  в целом протекало аналогично процессам мечения DOTA-P1 и DOTA-P2 (Рис.6), и в соответствии с нашей гипотезой о стерически меньшей доступности DOTA в DOTA-P2, мы ожидали различий в процессе мечения для «больших» катионов  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{Bi}^{3+}$ . Для  $\text{Eu}^{3+}$  оптимальные условия мечения (pH 8, 0,2 мМ DOTA-P4) аналогичны условиям для Eu-DOTA-P1, за исключением концентрации лиганда. Для  $\text{Bi}^{3+}$  только уменьшение значения pH (pH 8,0 было оптимальным для мечения как для DOTA-P1, так и для DOTA-P2) до 6 привело к увеличению степени мечения до 95-97%. Тем не менее, эти результаты, полученные при 90°C, однозначно указывают на важную роль расположения Thr-аминокислоты вблизи хелатирующего агента в процессе комплексообразования. Результаты мечения подтверждаются ВЭЖХ.

Доступность хелатирующего агента для катиона может коррелировать с площадью поверхности, доступной для растворителя (SASA). Результаты расчета траекторий, полученных методом молекулярной динамики, позволили оценить площадь поверхности DOTA в составе трех пептидных конъюгатов (Рис.7). Тот же диапазон SASA для DOTA в DOTA-P1 и DOTA-P4 по сравнению с более низкими значениями для DOTA-P2 также может указывать на стерические препятствия для процесса хелатирования.

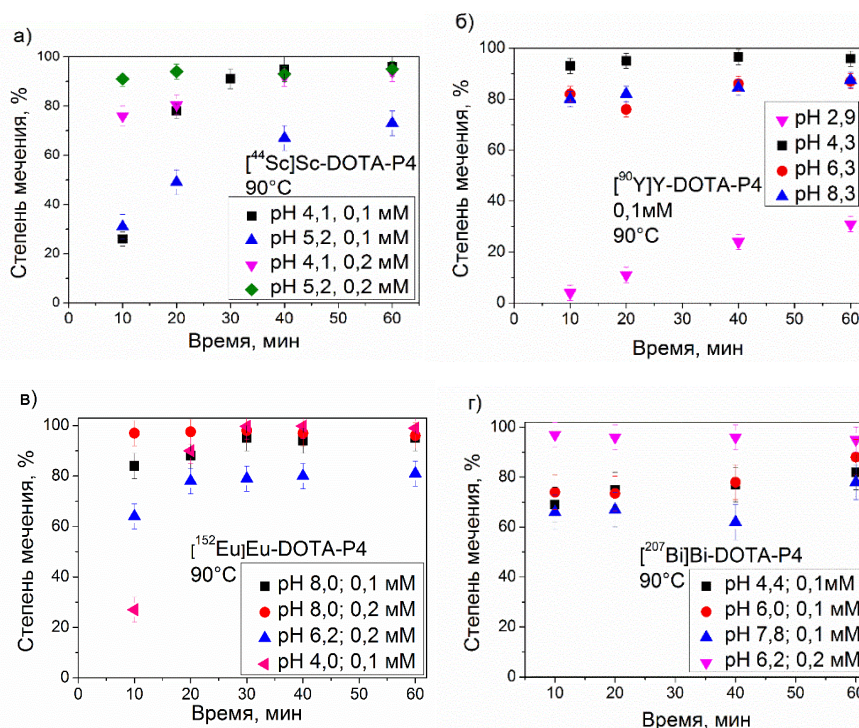


Рис.6. Зависимость степени мечения DOTA-P4 от времени катионами: а)  $^{44}\text{Sc}^{3+}$ , б)  $^{90}\text{Y}^{3+}$ , в)  $^{152}\text{Eu}^{3+}$  в)  $^{207}\text{Bi}^{3+}$ .

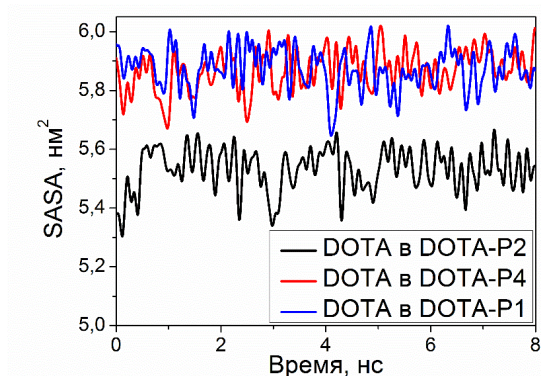


Рис. 7. Площадь поверхности фрагментов DOTA в составе пептидных конъюгатов, доступная для растворителя.

### Мечение DOTA-P3

Химическая структура конъюгата DOTA-P3 аналогична DOTA-P4 за исключением дополнительного From-фрагмента (From = 2-(3-((2-фторфенокси)-метил)-4-метоксифенил), связанного с аминокислотой Thz и находящегося в максимальном удалении от хелатора DOTA (Рис.1в). Предположительно, такой From-фрагмент может влиять на параметры сродства к целевым рецепторам.

Мечение DOTA-P3 проводили аналогично DOTA-P4. Полученные результаты мало отличаются от оптимальных условий, подобранных для DOTA-P4, можно лишь отметить тенденцию к преимуществу более низких значений pH (4-6) для крупных катионов Eu и Bi (рис.7). Вероятно, константы устойчивости комплексов [M-DOTA-P3] в целом меньше, чем аналогичные комплексы с другими конъюгатами, и при значениях pH>6 процессы гидролиза катионов начинают доминировать над процессом комплексообразования.

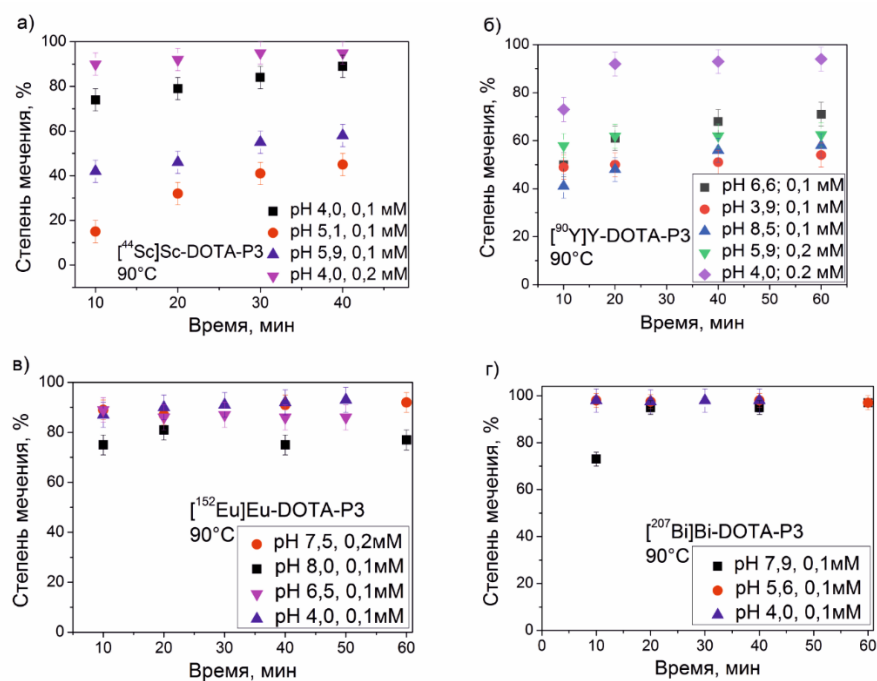


Рис.7. Зависимость степени мечения DOTA-P3 от времени катионами: а)  $^{44}\text{Sc}^{3+}$ , б)  $^{90}\text{Y}^{3+}$ , в)  $^{152}\text{Eu}^{3+}$  в)  $^{207}\text{Bi}^{3+}$ .

В таблице 3 сведены все условия, подобранные в данной работе для комплексов металлов с пептидными конъюгатами. Из представленных только результаты для Eu-DOТА-P2 и Bi-DOТА-P2 не отвечают очевидным требованиям, предъявляемым для синтеза радиофармпрепаратов.

Таблица 3. Оптимальные условия мечения для комплексов M-DOТА-P и Bi-L-P1.

<b>M<sup>3+</sup></b>	<b>DOТА-P1</b>	<b>L-P1</b>	<b>DOТА-P2</b>	<b>DOТА-P3</b>	<b>DOТА-P4</b>
<b><sup>44</sup>Sc<sup>3+</sup></b>	5·10 <sup>-5</sup> М, рН 4,0-4,5, 90°С, 20-30 мин	-	2·10 <sup>-4</sup> М, рН 4,0-4,5, 90°С, 20 мин	2·10 <sup>-4</sup> М, рН 4,0, 90°С, 20 мин	2·10 <sup>-4</sup> М, рН 5,0, 90°С, 20 мин
<b><sup>90</sup>Y<sup>3+</sup></b>	1·10 <sup>-4</sup> М, рН 6,4-8,4, 90°С, 20-30 мин	-	1·10 <sup>-4</sup> М, рН 3,9-4,1, 90°С, 10-20 мин	2·10 <sup>-4</sup> М, рН 4,0-6,0, 90°С, 20 мин	1·10 <sup>-4</sup> М, рН 4,0, 90°С, 20 мин
<b><sup>152</sup>Eu<sup>3+</sup></b>	1·10 <sup>-4</sup> М, рН 8,0-8,4, 90°С, 20-30 мин	-	1·10 <sup>-4</sup> М, рН 8,0-8,4, 37°С, 4 д	2·10 <sup>-4</sup> М, рН 4,0-6,0, 90°С, 20 мин	2·10 <sup>-4</sup> М, рН 8,0-8,4, 90°С, 10 мин
<b><sup>207</sup>Bi<sup>3+</sup></b>	1·10 <sup>-4</sup> М, рН 8,0-8,4, 90°С, 20-30 мин	2·10 <sup>-3</sup> М, рН 6,0-8,0, 25°С, 20-30 мин	1·10 <sup>-4</sup> М, рН 8,0-8,4, 37°С, 4 д	1·10 <sup>-4</sup> М, рН 4,0-6,0, 90°С, 10 мин	2·10 <sup>-4</sup> М, рН 6,0, 90°С, 10 мин

## 2. Исследование стабильности комплексов в условиях *in vitro*

Для оценки стабильности исследуемых комплексов в условиях *in vitro* использовали комплексы M-DOТА-P с радиохимической чистотой от 95% до 98%.

### *Стабильность в сыворотке*

Радиоактивную фракцию, перехелатированную белками сыворотки, определяли за счет разделения белков сыворотки путем их осаждения этанолом (полноту осаждения белков проверяли с помощью метода Бредфорда). Полученные результаты демонстрируют, что при 100-кратном избытке сыворотки (пептид разбавлен до 1 мкМ) наблюдается высвобождение от 10% до 20% катиона из комплексов M-DOТА-P (P=P1, P2, P4) в течение 30-60 минут (Рис.8). После 1 дня инкубации увеличения доли катиона, связанного с белком, не происходит. Из четырех DOТА-конъюгатов наибольшую стабильность демонстрируют комплексы M-DOТА-P4 (более 85% в течение 24 ч). Комплекс Bi-DOТА-P3, наоборот, показал наименьшую стабильность: около 50% общей радиоактивности высвобождается сразу в момент смешивания образца комплекса и сыворотки. Возможно, в силу отличной от P3Э химической природы висмута, при образовании комплекса [<sup>207</sup>Bi]Bi-DOТА-P3 часть катионов висмута связывается не с DOТА, а координируется концевым From-фрагментом и легко перехелатируется белками сыворотки.

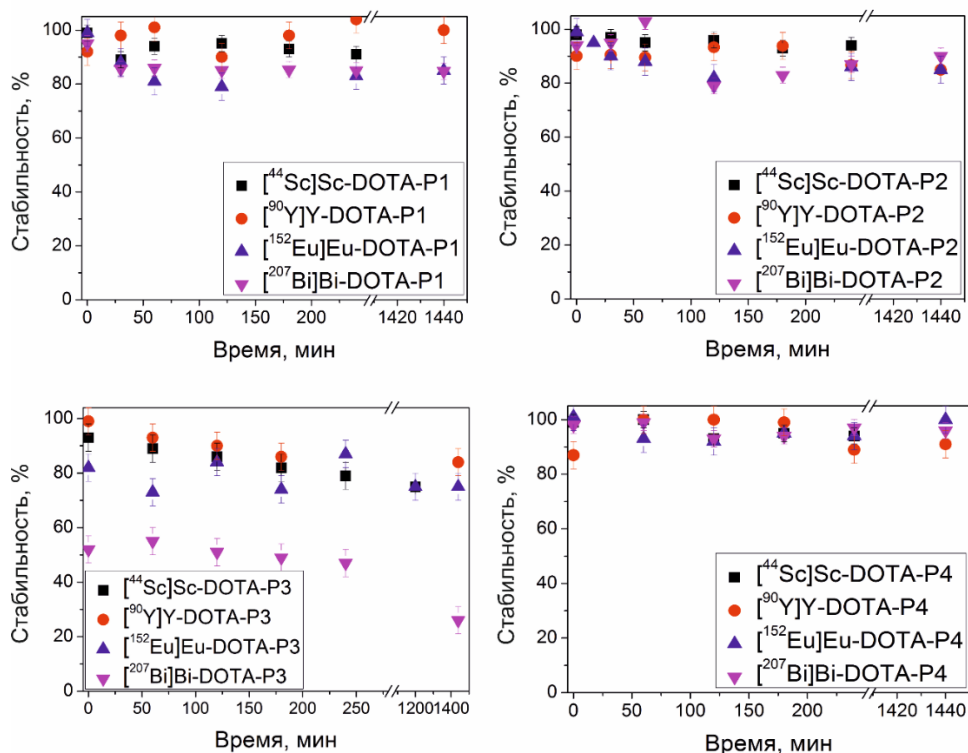


Рис. 8. Стабильность в сыворотке для комплексов M-DOTA-P.

В целом, стабильность исследуемых конъюгатов согласуется с данными для других конъюгатов DOTA, которые показывают, что комплексы DOTA сохраняют высокую кинетическую стабильность даже после их конъюгирования с пептидами.

На устойчивость в сыворотке был также проверен комплекс Vi-L-P1 (Рис.9). Оказалось, что высвобождение 50% катиона происходит быстрее, чем в случае комплекса ViL, в течение 1 часа. Идентификацию несвязанной с сывороткой фракции проводили методом ТСХ, что подтверждало, что не связанный с сывороткой радионуклид находится в составе комплекса Vi-L-P1. В любом случае, конъюгат L-P1 не демонстрирует высокой стабильности получаемых комплексов, поэтому в рамках данной работы далее рассматривались только DOTA-пептиды.

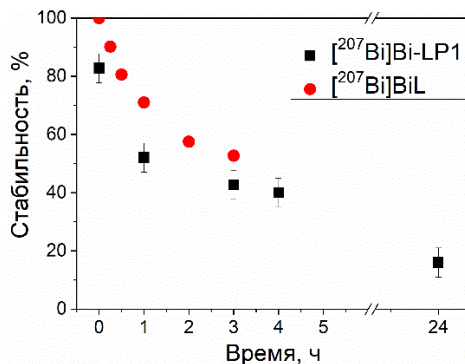


Рис. 9. Стабильность комплексов Vi-L-P1 и Vi-L в сыворотке.

### ***Устойчивость в физиологическом растворе и в присутствии биогенных катионов***

Стабильность комплексов M-DOTA-P также анализировали в 0,9% растворе NaCl и в присутствии различных катионов металлов при 37°C. Все комплексы сохранили свою степень мечения не менее 80% при инкубации в течение 4-24 часов (Таблица 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что несмотря на то, что в комплексах M-DOTA-P катион металла координируется меньшим количеством связей, чем в аналогичных комплексах M-DOTA (одна карбоксильная группа участвует в образовании ковалентной связи с пептидом), устойчивость исследуемых комплексов остается высокой и достаточной для применения рассматриваемых соединений в составе РФЛП (исключение –  $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-P3}$ ).

Таблица 4. Устойчивость (в %) комплексов [M]M-DOTA-P4 при 37°C в физиологическом растворе и в присутствии катионов металлов в течение 24 ч (4 ч для  $^{44}\text{Sc}^{3+}$ ).

	0,9% NaCl	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
$[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-DOTA-P4}$	90,5	89,5	92	91	93,5	89
$[^{90}\text{Y}]\text{Y-DOTA-P4}$	92	93,5	94	92	91,5	88
$[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$	92	95,5	94	91,5	93	90
$[^{207}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-P4}$	97	94	95	94	93	92

### **3. Средство конъюгатов и меченных комплексов к рецепторам соматостатина**

Для ответа на вопрос, могут ли исследуемые конъюгаты DOTA-P выступать в качестве аналогов соматостатина, были проведены теоретические расчеты энергии связи для комплексов «рецептор-лиганд», а также эксперименты на клеточной линии IMR-32 (человеческая нейробластома), экспрессирующей рецепторы соматостатина типов 2 и 5.

#### ***Анализ средства исследуемых конъюгатов коротких пептидов DOTA-P***

#### ***к рецепторам соматостатина с помощью метода молекулярного докинга***

Соматостатин имеет пять подтипов рецепторов (SSTR1 – SSTR5), которые экспрессируются в органах центральной нервной системы и желудочно-кишечного тракта. Базы данных белковых структур не располагают данными о 3D структуре хотя бы одного из подтипов SSTR, полученных по результатам ЯМР-спектроскопии или другими экспериментальными методами, поэтому данные структуры могут быть получены только с помощью методов молекулярного моделирования.

Моделирование третичной структуры SSTR1-5 осуществлялось с помощью гомологического моделирования с использованием сервиса Phyre2. Уточнение полученных структур, оптимизация геометрии и минимизация энергии проводились с помощью методов молекулярной динамики. Траектории рассчитывались с длительностью по времени 10-20 нс с помощью гри-вычислительных кластеров суперкомпьютера Ломоносов.



Из полученных моделей третичной структуры была выбрана модель SSTR2 как наиболее часто встречаемого рецептора. Данная модель была использована для определения сродства исследуемых пептидов к SSTR2. Для этого с помощью программы Autodock был проведен молекулярный докинг SSTR2 и исследуемых конъюгатов (Рис.10). В качестве области связывания выбиралась область рецептора с аминокислотами Asn276 и Phe294 в центре, поскольку эти аминокислоты являются ключевыми для процесса связывания лиганда [4]. Так как октреотид и DOTATATE способны связываться с SSTR2, они использовались для сравнения.

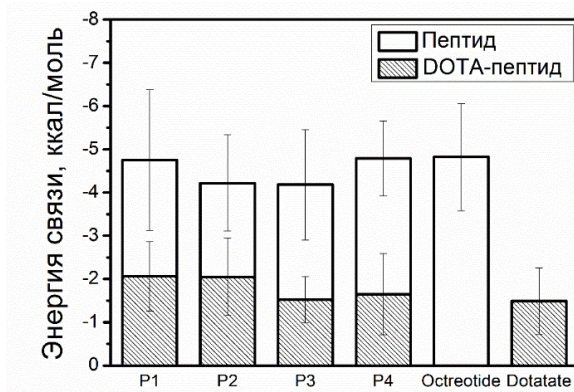


Рис. 10. Энергии связи SSTR2 с различными лигандами.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что исследуемые пептиды P1-P4 связываются с SSTR2 примерно на том же уровне, что и октреотид. При конъюгировании пептидов с DOTA энергия связи падает для всех пептидов, однако остается сопоставимой с энергией связи SSTR2-DOTATATE. Поскольку комплексы радионуклидов с DOTATATE эффективно применяются при терапии и диагностике SSTR2-экспрессирующих опухолей, близкие энергии связи исследуемых конъюгатов могут указывать на перспективность DOTA-P в качестве аналогов соматостатина.

#### ***Экспериментальный анализ сродства пептидных конъюгатов к рецепторам соматостатина***

Связывание DOTA-P (P=P1, P3, P4) с клетками IMR-32 определяли методом конкурентного связывания в присутствии 100- или 1000-кратного избытка октреотида в зависимости от возрастающих концентраций  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P}$  при 4°C через 2 часа. Клетки IMR-32 экспрессируют SSTR2 и SSTR5, при этом октреотид связывается с этими же типами рецепторов. Для конъюгата DOTA-P4 наблюдается разница между скоростью счета клеточной фракции в отсутствие (полное связывание) и в присутствии октреотида (неспецифичное связывание), что может указывать на наличие специфичного связывания (разница между полным и неспецифичным) с рецепторами (Рис.11). Неспецифичное связывание при наивысшей концентрации DOTA-P4 оказалось 26% от общего и в среднем составило 18%. Кривая насыщения была обработана с помощью метода нелинейной регрессии, в результате чего была рассчитана кажущаяся константа диссоциации комплекса «рецептор-лиганд»  $K_d$ , которая составила  $1,56 \pm 0,58$  нМ.

Для конъюгатов DOTA-P1 и DOTA-P3 также наблюдается разница между скоростью счета клеточной фракции в отсутствии и в присутствии октреотида, что подтверждает специфичность по отношению к SSSTR2 и SSSTR5. Однако при этом в обоих случаях присутствует неспецифичное связывание, превышающее аналогичный параметр для DOTA-P4. Полученные значения  $K_d$  согласуются со значениями для других меченых конъюгатов соматостатина: Ga-DOTATOC (2,5 нМ), In-DTPA-[Tyr<sup>3</sup>]-октреотат (1,3 нМ), Ga-DOTATATE (0,2 нМ) и демонстрируют лучшее сродство по сравнению с In-DTPA-октреотид (22 нМ) и Y-DOTATOC (11 нМ) [4-5].

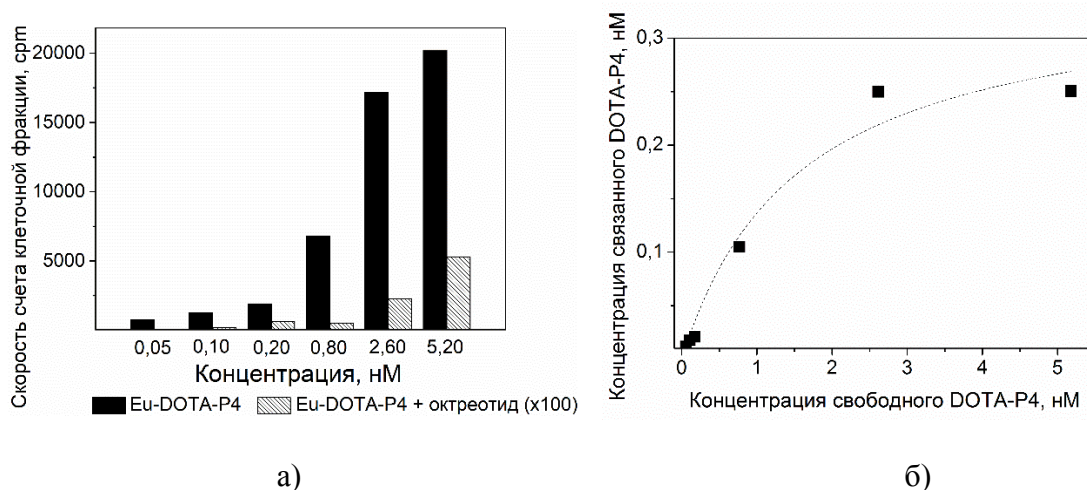


Рис.11. Связывание [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTA-P4 с клетками IMR-32 в присутствии и в отсутствии октреотида (а) и кривая насыщения (б).

#### 4. Исследование вторичной структуры конъюгатов коротких пептидов

Для сохранения биологической активности соматостатиновых аналогов в их структуре должен присутствовать фармакофор Trp<sup>4</sup>-Lys<sup>5</sup> в форме β-петли, поэтому в данной работе было выполнено исследование вторичной структуры четырех DOTA-конъюгатов, а также их комплексов со скандием с помощью спектроскопии кругового дихроизма.

Форма полученных спектров для конъюгатов DOTA-P (Рис.12а) демонстрирует отсутствие различий в форме спектра между конъюгатами DOTA-P1 и DOTA-P2; то есть при добавлении аминокислоты Thz между хелатором и основной тетра-последовательностью вторичная структура конъюгата не изменяется. Наличие отрицательного и положительного пиков при 225 и 205 нм в спектрах DOTA-P4 может указывать на наличие типа структуры β-поворот в структуре пептидного конъюгата. Отдельно можно отметить, что форма спектра для DOTA-P3 имеет мало общего со всеми остальными конъюгатами, что может свидетельствовать, что наличие From-фрагмента не способствует принятию более выгодной конформации, а скорее наоборот, негативно влияет на данный фактор, что согласуется с результатами по сродству DOTA-P4 и DOTA-P3 к клеткам IMR-32.

В случае конъюгатов Sc-DOTA-P (Рис.12б) важно отметить, что образование комплекса с металлом может повлиять на вторичную структуру, но не для всех молекул. При образовании комплекса со скандием форма спектра для DOTA-P1 меняется, и вновь наблюдается отрицательный пик при 225 нм. Для конъюгатов DOTA-P3 и DOTA-P4 характер спектров не

претерпевает существенных изменений при образовании комплекса с металлом. Конъюгат DOTA-P4, по-видимому, обладает самой стабильной и наиболее подходящей вторичной структурой, как в «свободном», так и в состоянии комплекса с металлом.

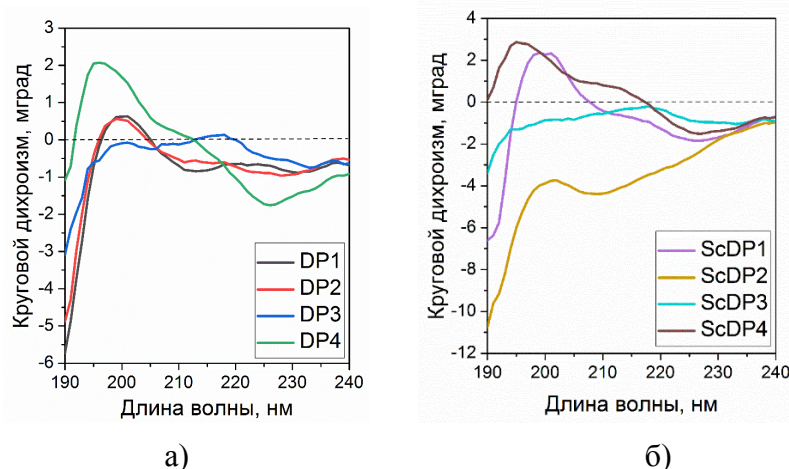


Рис. 12. Спектры кругового дихроизма для свободных конъюгатов (а) и конъюгатов в комплексе со скандием (б) (DP=DOTA-P).

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что на вторичную структуру пептидных конъюгатов влияет не только их состав, но и положение отдельных фрагментов относительно аминокислотной последовательности. Единственным конъюгатом, чья форма спектра обладает признаками  $\beta$ -поворота, и который, соответственно, отвечает главному структурному требованию, предъявляемому к соматостатиновым аналогам, является DOTA-P4.

### 5. Исследование биораспределения и устойчивости комплексов *in vivo*

Для исследования биораспределения комплексов пептидных конъюгатов на иммунодефицитных мышах использовалась клеточная линия нейробластомы человека IMR-32, которая ранее была использована для анализа сродства конъюгатов к рецепторам. Цель данного исследования заключалась как в установлении факта нацеливания и накопления исследуемых конъюгатов в новообразовании (опухоли), так и оценка устойчивости комплексов в условиях живого организма.

С целью соблюдения принципов гуманного обращения с лабораторными животными и минимизации количества животных, используемых в эксперименте, на данном этапе изучался только конъюгат DOTA-P4, поскольку именно он демонстрировал лучшие результаты на всех предыдущих этапах работы. Все работы с использованием лабораторных животных были одобрены Комиссией МГУ по биоэтике (заявка 128-а, редакция №2, протокол заседания 131-д от 31.05.2021).

Животные были разделены на группы в зависимости от вводимого вещества: 1) исследуемый комплекс  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$ , 2)  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTATATE}$  – вещество, выступающее в качестве положительного контроля, поскольку комплексы радионуклидов РЗЭ с DOTATATE должны накапливаться в опухоли, на поверхности которой присутствуют рецепторы SSTR2,5, 3)  $[^{152}\text{Eu}]\text{EuCl}_3$  - отрицательный контроль, 4)  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$  + 10-кратный избыток октреотида. Полученные данные о распределении всех вводимых веществ частично представлены на рис. 13.

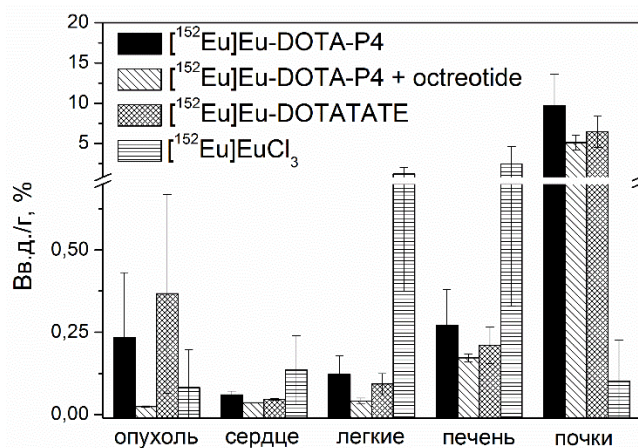


Рис.13. Распределение меченных соединений <sup>152</sup>Eu через 6 ч после введения. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение, n=4.

Катионы европия, не связанные изначально в комплекс, преимущественно накапливаются в легких, печени и селезенке, в то время как для исследуемого комплекса [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTA-P4 наибольшее накопление регистрируется в почках, как и для [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTATATE. Комплексы [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTATATE и [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTA-P4 подвергаются почечному клиренсу, что подтверждается результатами измерения собранной в течение 6 часов мочи. При этом результаты анализа собранной мочи в группах 1 и 2 с помощью ВЭЖХ (Рис. 14) и ТСХ демонстрируют наличие в ней только исходных комплексов, что в совокупности подтверждает устойчивость комплексов [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTA-P4 и [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTATATE в условиях *in vivo*. Также стоит отметить, что накопление препарата в почках связано с наличием в почках тех же рецепторов соматостатина.

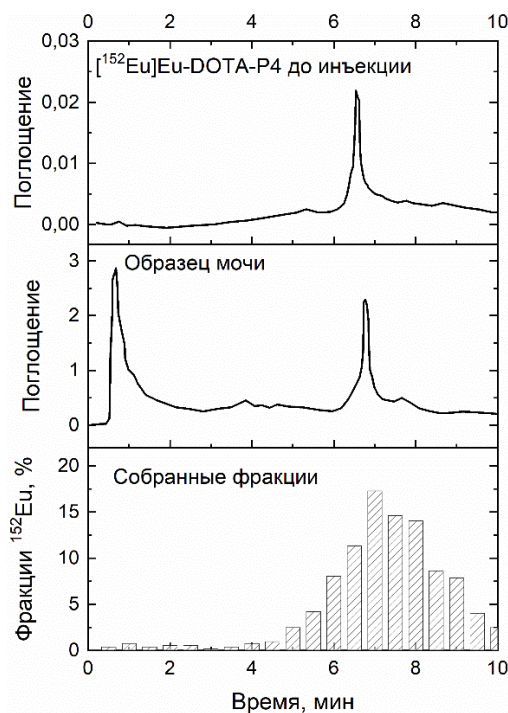


Рис. 14. Хроматограммы ВЭЖХ для комплекса [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTA-P4 до инъекции, соответствующего образца мочи и результаты измерения радиоактивности собранных фракций для образца мочи.

В целом, преимущественное накопление [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTATATE в почках, а не в опухоли может свидетельствовать о большем количестве рецепторов SST в них (могут присутствовать и другие типы) и о низкой плотности SSTR<sub>2,5</sub> в клетках IMR-32. Эксперимент с «заблокированными» рецепторами (группа №4) показал, что накопление [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4 в некоторых органах, экспрессирующих SSTR, существенно снижается по сравнению с животными, которым предварительно не вводился октреотид, что может подтверждать сохранение специфичности [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4 по отношению к SSTR в условиях *in vivo*, однако отсутствие снижения такого накопления в мозге не позволяет считать этот факт доказанным.

Таким образом, учитывая, что биораспределение исследуемого комплекса [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4 по своим численным значениям ближе к распределению [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTATATE, чем [ $^{152}\text{Eu}$ ]EuCl<sub>3</sub>; а также результаты ВЭЖХ собранной мочи, можно говорить об устойчивости комплекса [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4 в условиях *in vivo*.

#### 6. Сравнение комплексов [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4 и [ $^{161}\text{Tb}$ ]Tb-DOTA-P4

Поскольку большинство экспериментальных данных в настоящей работе было получено с радионуклидом  $^{152}\text{Eu}$ , при этом среди изотопов европия нет ни одного, применяющегося или перспективного с точки зрения ядерной медицины, результаты, полученные для комплекса [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4, было решено сравнить с комплексом DOTA-P4 с катионом тербия.

Несмотря на то, что европий и тербий не самые ближайшие соседи по периодической таблице, с точки зрения радиуса атома, гидролизного поведения, а также координационной химии европий и тербий действительно обладают близкими свойствами (Таблица 5).

Таблица 5. Сравнительные характеристики лантаноидов: Eu, Gd, Tb.

$M^{3+}$	$R_i$ (CN 8), Å [1]	$\lg \beta_{M-OH}$ [2]	$\lg \beta_{M-DOTA}$
<b>Eu<sup>3+</sup></b>	1,07	-7,90	26,2; 28,2 [7,8]
<b>Gd<sup>3+</sup></b>	1,05	-7,93	25,8 [9]
<b>Tb<sup>3+</sup></b>	1,04	-7,86	28,6 [8]

Тербий имеет 4 изотопа с массовыми числами 149, 152, 155 и 161, представляющих интерес для ядерной медицины. В данной работе был выбран радионуклид Tb-161 и для его получения было решено исследовать возможности альтернативного пути получения с использованием ускорителя электронов, так как данный способ всё больше рассматривается при получении медицинских радионуклидов. Мишень из оксида диспрозия природного изотопного состава была облучена на тормозном пучке разрезного микротрона НИИЯФ МГУ им. Д.В. Скобельцина гамма-квантами с максимальной энергией 55 МэВ в течение ~7 часов. По результатам облучения и выделения активность  $^{161}\text{Tb}$  в мишени составила 380 Бк, что оказалось

достаточно лишь для проведения исследования по мечению и устойчивости комплексов с DOTA-P4.

### Мечение DOTA-P4 катионами $^{161}\text{Tb}^{3+}$

Подбор условий для анализа комплекса  $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOTA-P4}$  методом ТСХ подтвердил пригодность систем, использовавшихся при анализе  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$ . Результаты мечения DOTA-P4 катионами  $^{161}\text{Tb}$  демонстрируют высокую радиохимическую чистоту уже через 5 минут после начала реакции (Рис. 15а), что даже превышает скорость реакции мечения в сравнении с катионами европия, что может быть связано с более высоким значением константы устойчивости комплекса Tb-DOTA по сравнению с Eu-DOTA. Полученный комплекс со степенью мечения 95-98% был исследован на устойчивость в избытке сывороточных белков. В течение 24 ч устойчивость комплекса остается на уровне 90%, что коррелирует со значениями, полученными для европиевого комплекса (рис.15б).

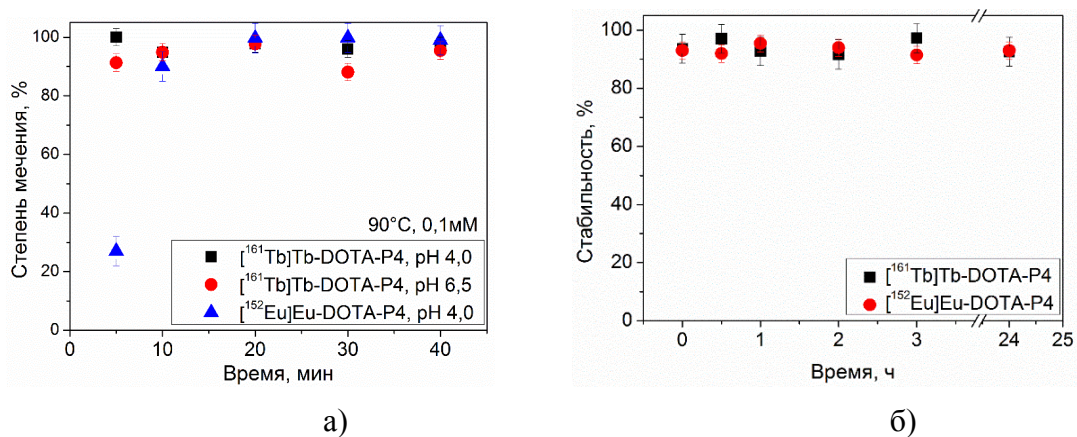


Рис. 15. Зависимость степени мечения DOTA-P4 катионами  $^{161}\text{Tb}^{3+}$  и  $^{152}\text{Eu}^{3+}$  от времени (а) и устойчивость комплекса  $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOTA-P4}$  и  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$  в сыворотке (б).

Таким образом, потенциальный медицинский изотоп  $^{161}\text{Tb}$  может быть получен с помощью фотоядерного облучения мишени из оксида диспрозия природного состава. При мечении конъюгата DOTA-P4 катионами  $^{161}\text{Tb}$  комплекс образуется с высоким выходом уже через 5 минут после начала реакции и устойчив в сыворотке в течение 24 ч, что согласуется с предварительными оценками на катионе европия.

### Выводы

1. Определены оптимальные условия синтеза для всех комплексов M-DOTA-P и Vi-L-P1: достаточная степень связывания радионуклидов в комплекс (более 95%) достигается при  $T=90^\circ\text{C}$ , концентрации конъюгата  $5 \cdot 10^{-5} \div 2 \cdot 10^{-4}$  М, pH 4-8 в течение 10-30 мин. Подобранные условия отвечают первичным требованиям, предъявляемым к синтезу радиофармпрепаратов, за исключением комплексов M-DOTA-P2, где  $M=^{152}\text{Eu}$ ,  $^{207}\text{Bi}$ .
2. Все комплексы M-DOTA-P устойчивы в биологически релевантных средах в течение 4-24 ч, что подтверждает высокую устойчивость комплексов с хелатором DOTA, которая сохраняется и

после конъюгирования с пептидом. Комплекс висмута с конъюгатом на основе другого хелатора Bi-L-P1 оказался не устойчив в сыворотке.

3. Перенос хелатора к С-концу аминокислотной цепи повышает его стерическую доступность для катиона, что подтверждается как результатами мечения конъюгатов DOTA-P2 и DOTA-P4 крупными катионами  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{Bi}^{3+}$ , так и величиной рассчитанной площади хелатора, доступной для растворителя.

4.  $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P3 и  $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4 связываются с SSTR2,5 на поверхности клеток IMR-32 с константами диссоциации комплекса «рецептор-лиганд»  $K_d = 0,73 \pm 0,07$  и  $K_d = 1,56 \pm 0,58$  нМ соответственно, при этом  $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4 демонстрирует существенно меньшее неспецифичное связывание (18% в среднем).

5. Только конъюгат DOTA-P4 обладает необходимой конформацией  $\beta$ -поворот ( $\beta$ -петля) в свободной форме и в комплексе с металлом;

6. Комплекс  $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4 демонстрирует устойчивость в условиях *in vivo* на мышах с привитыми опухолями IMR-32 в течение 6 ч.

7. При мечении конъюгата DOTA-P4 катионами  $^{161}\text{Tb}^{3+}$  комплекс образуется с высоким выходом уже через 5 минут после начала реакции и устойчив в сыворотке в течение 24 ч, что показывает правомочность использования катиона  $\text{Eu}^{3+}$  как химического аналога  $\text{Tb}^{3+}$  в исследованиях получения и стабильности меченных соединений.

#### **Публикации автора с соавторами по теме диссертации**

**Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus**

1. Yakusheva A.O., Titchenko N.A., Egorova B.V., Matazova E.V., Podkhalyuzina N., Osipov V.N., Khachatryan D.S., Avdeev D., Posypanova G.A., Kalmykov S.N. From octreotide to shorter analogues: synthesis, radiolabeling, stability // Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 2019. Vol. 62, № 11. P. 718–728. (Scopus, WoS, IF 1,95; 1 п.л./60%)
2. Fedotova (Yakusheva) A.O., Egorova B.V., Posypanova G.A., Titchenko N.A., Khachatryan D.S., Kolotaev A.V., Osipov V.N., Kalmykov S.N. Labeling and receptor affinity of ultra-short somatostatin analogue Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA // Journal of Peptide Science. 2021. Vol. 27, № 12. P. e3361. (Scopus, WoS, IF 2,41; 0,9 п.л./60%)
3. Fedotova A.O., Aliev R.A., Egorova B.V., Kormazeva E.S., Konevega A.L., Belyshev S.S., Khankin V.V., Kuznetsov A.A., Kalmykov S.N. Photonuclear production of medical radioisotopes  $^{161}\text{Tb}$  and  $^{155}\text{Tb}$  // Applied Radiation and Isotopes. 2023. Vol. 198. P. 110840. (Scopus, WoS, IF 1,79; 0,6 п.л./50%)
4. Fedotova A.O., Egorova B.V., Aleshin G.Yu., Zamurueva L.S., Aliev R.A., Posypanova G.A., Priselkova A.B., Kolotaev A.V., Khachatryan D.S., Osipov V.N., Kalmykov S.N.  $^{161}\text{Tb}$ ]Tb-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA: a potential radiopharmaceutical for the treatment of neuroendocrine

tumors // Mendeleev Communications. 2023. Vol. 33. No. 4. P. 469-471. (Scopus, IF 1,84; 0,3 п.л./60%)

### Прочие публикации

1. Егорова Б.В., Федотова А.О., Колотаев А.В., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С. Способ получения конъюгата  $\text{Woc-Thz-Phe-D-Trp-Lys(Woc)-Thr-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-DOТА}$ , являющегося прекурсором для противоопухолевых радиофармпрепаратов. Патент RU 2795447 С1, 3.05.2023.
2. Федотова А.О., Егорова Б.В., Алешин Г.Ю., Посыпанова Г.А., Хачатрян Д.С., Колотаев А.В., Осипов В.Н., Калмыков С.Н. Комплексы  $\text{PZЭ}^{3+}$  и  $\text{Bi}^{3+}$  с конъюгатами коротких аналогов соматостатина // тезисы конференции «X Российская конференция с международным участием «Радиохимия-2022», 2022, Россия, с. 529.
3. Федотова А.О., Егорова Б.В., Посыпанова Г.А., Титченко Н.А., Хачатрян Д.С., Колотаев А.В., Осипов В.Н., Калмыков С.Н. Комплексы  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$  с конъюгатами ультракоротких пептидов как потенциальные компоненты радиофармпрепаратов // тезисы конференции «X Российский симпозиум «Белки и пептиды», 2021, Россия, с.281.
4. Федотова А.О., Егорова Б.В., Посыпанова Г.А., Хачатрян Д.С., Колотаев А.В., Осипов В.Н., Калмыков С.Н. Конъюгаты ультракоротких пептидов для диагностики и терапии опухолей, экспрессирующих рецепторы соматостатина // тезисы конференции «IV Международная научно-практическая конференция «Радиофарма-2021», 2021, Россия, с.23.
5. Якушева А.О., Митрофанов А.А., Егорова Б.В., Калмыков С.Н. Theoretical analysis of binding interaction between short peptides and somatostatin receptor type 2 // тезисы конференции «Mendeleev 2019», 2019, Россия, С.442.
6. Якушева А.О., Егорова Б.В., Матазова Е.В., Титченко Н.А., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С., Авдеев Д.В., Калмыков С.Н. Конъюгаты коротких аналогов соматостатина: комплексообразование и связывание с рецептором // тезисы конференции «III Международная научно-практическая конференция «Радиофарма-2019», 2019, Россия, С.20.
7. A. Yakusheva, B. Egorova, E. Matazova, V. Osipov, D. Khachatryan, D. Avdeev, S. Kalmykov, Complexes of  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$  with conjugates of short somatostatin analogues for the diagnosis and therapy of cancer // тезисы конференции «ISMEC 2019», 2019, Венгрия, С.183-184.
8. Yakusheva A.O., Egorova B.V., Matazova E.V., Titchenko N.A., Osipov V.N., Khachatryan D.S., Avdeev D.V., Kalmykov S.N. Complexes of  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$  with DOTA-tetrapeptide and DOTA-pentapeptide conjugates for the diagnosis and therapy of cancer // тезисы конференции «V International Scientific Conference «Advances in synthesis and complexing», 2019, Россия, С.30.
9. Yakusheva A.O., Egorova B.V., Mitrofanov A.A., Khachatryan D.S., Osipov V.N., Avdeev D.V., Kalmykov S.N. Europium complexes with DOTA-tetrapeptide and DOTA-pentapeptide



- conjugates // тезисы конференции «The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research», 2019, Россия, С.42.
10. Якушева А.О., Егорова Б.В., Митрофанов А.А., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С., Авдеев Д.В., Kalmykov S.N. Комплексы европия с конъюгатами DOTA-тетрапептид и DOTA-пентапептид // тезисы конференции «IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018», 2018, Россия, С.529.

### Список литературы

1. Shannon R. D. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides // *Acta Crystallogr. Sect. A*. 1976. Vol. 32. P. 751–767.
2. Baes C. F. and Mesmer R. E. // *The Hydrolysis of Cations*. 1976. New York: John Wiley & Sons, Inc.
3. Egorova B. V. *et al.* Novel pyridine-containing azacrownethers for the chelation of therapeutic bismuth radioisotopes: Complexation study, radiolabeling, serum stability and biodistribution // *Nucl. Med. Biol.* 2018. Vol. 60. P. 1–10.
4. Kaupmann K. *et al.* Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor // *EMBO J.* 1995. Vol. 14, No. 4. P. 727–735.
5. Reubi J. C. *et al.* Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1–SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use // *Eur J Nucl Med.* 2000. Vol. 27, No. 3. P. 273–282.
6. Koumariou E. *et al.* Comparison of receptor affinity of  $^{nat}\text{Sc}$ -DOTATATE versus  $^{nat}\text{Ga}$ -DOTATATE // *Nucl. Med. Rev.* 2011. Vol. 14, No. 2. P. 85–89.
7. Wu Ling S., Horrocks W.D. Direct determination of stability constants of lanthanide ion chelates by laser-excited europium(III) luminescence spectroscopy: Application to cyclic and acyclic;aminocarboxylate complexes // *J. Chem. Soc. - Dalt. Trans.* 1997. № 9. P. 1497–1502.
8. Loncin M.F., Desreux J.F., Merciny E. Coordination of Lanthanides by Two Polyamino Polycarboxylic Macrocycles: Formation of Highly Stable Lanthanide Complexes // *Inorg. Chem.* 1986. Vol. 25, № 15. P. 2646–2648.
9. Morcos S.K. Extracellular gadolinium contrast agents: Differences in stability // *Eur. J. Radiol.* 2008. Vol. 66, № 2. P. 175–179.

## Благодарности

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю Егоровой Байирте Владимировне за всестороннюю поддержку, вовлеченность и созидательную атмосферу.

Автор выражает благодарность Хачатряну Деренику Саркисовичу, Колотаеву Антону Владимировичу и Осипову Василию Николаевичу за предоставленные пептидные конъюгаты. Автор благодарит сотрудников: Посыпанову Галину Ароновну, Алиева Рамиза Автандиловича, Варижук Анну Михайловну, сотрудников НИИЯФ МГУ им. Д.В. Скобельцина за их помощь в проведении отдельных экспериментов.

Автор выражает особую признательность и благодарность Соболеву Александру Сергеевичу, Жуйкову Борису Леонидовичу и Орловой Марине Алексеевне за ценные замечания при подготовке диссертации.

Автор выражает огромную благодарность сотрудникам лаборатории РФХ: Замуруевой Любове Сергеевне, Алешину Глебу Юрьевичу, Хабировой Софье Юрьевне и Титченко Николаю Андреевичу за их помощь в работе в условиях *in vivo*.

Автор благодарит Митрофанова Артема Александровича за знакомство с командной строкой и миром суперкомпьютеров.

Автор выражает благодарность преподавателям кафедры радиохимии, в частности, Северину Александру Валерьевичу и Афиногенову Алексею Максимовичу, и всему коллективу лабораторий ДиРОС и РФХ за интересные дискуссии и дружелюбную атмосферу.

Автор выражает особую благодарность Калмыкову Степану Николаевичу за вдохновение и помощь в выборе научного направления.

Автор выражает глубокую признательность своим близким, в особенности Федотову Станиславу Сергеевичу, Якушевой Ларисе Витальевне, Матазовой Екатерине Викторовне, Евсюниной Марии Валерьевне, Замуруевой Любове Сергеевне, Бахия Тамуне Романовне за их безграничную поддержку и участие на всех этапах подготовки данной работы.

Работа выполнена в рамках проекта № 075-15-2020-782 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и РФФИ №18-03-00891. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В.Ломоносова.