

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



**Федотова Анжелика Олеговна**

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

1.4.13 – радиохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

с.н.с., к.х.н. Егорова Б.В.

Москва – 2023

## Оглавление

Список условных обозначений и сокращений.....	4
Введение .....	5
Глава 1. Обзор литературы .....	10
1.1. Соматостатин .....	10
1.2. Пептидные аналоги соматостатина .....	12
1.3. Пептидные аналоги-антагонисты .....	19
1.4. Непептидные аналоги соматостатина .....	20
1.5. Непептидные антагонисты соматостатина .....	22
1.6. Ультракороткие пептидные аналоги .....	23
1.7. Макроциклический хелатор DOTA .....	25
1.8. Ациклические хелаторы DTPA и CHX-A''-DTPA .....	28
1.9. Первые комплексы аналогов соматостатина с радионуклидами .....	30
1.10. Аналоги соматостатина, меченые $^{90}\text{Y}$ , $^{177}\text{Lu}$ .....	31
1.11. Аналоги соматостатина, меченые $^{212,213}\text{Bi}$ .....	33
1.12. Аналоги соматостатина, меченые радионуклидами Sc и Tb .....	34
1.13. Заключение из обзора литературы .....	37
Глава 2. Экспериментальная часть.....	39
2.1. Материалы и оборудование.....	39
2.2. Генератор $^{44}\text{Ti}$ - $^{44}\text{Sc}$ .....	42
2.3. Синтез комплексов M-DOTA-P и Bi-L-P1 .....	42
2.4. Тонкослойная хроматография.....	42
2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	43
2.6. Стабильность в физиологическом растворе .....	44
2.7. Стабильность в сыворотке.....	45
2.8. Стабильность в присутствии биологически значимых катионов.....	45
2.9. Масс-спектрометрия .....	46
2.10. Анализ сродства меченных комплексов к рецепторам соматостатина .....	46
2.11. Спектроскопия кругового дихроизма.....	47
2.12. Проведение экспериментов <i>in vivo</i> .....	47
2.13. Фотоядерное получение и выделение $^{161}\text{Tb}$ .....	49
2.14. Расчетная часть .....	52

Глава 3. Определение оптимальных условий образования меченных комплексов.....	54
3.1. Подбор условий для анализа методом тонкослойной хроматографии.....	54
3.2. Мечение DOTA-P1 .....	56
3.3. Мечение DOTA-P2 .....	62
3.4. Мечение L-P1 .....	67
3.5. Мечение DOTA-P4 .....	68
3.6. Мечение DOTA-P3 .....	71
Глава 4. Стабильность меченных комплексов в условиях <i>in vitro</i> .....	73
4.1. Стабильность в сыворотке.....	73
4.2. Стабильность в физиологическом растворе и в присутствии биогенных катионов .....	75
Глава 5. Анализ сродства конъюгатов и меченных комплексов к рецепторам соматостатина.....	77
5.1. Анализ сродства исследуемых конъюгатов коротких пептидов DOTA-P к рецепторам соматостатинового ряда с помощью расчетных методов .....	77
5.2. Экспериментальный анализ сродства пептидных конъюгатов к рецепторам соматостатина .....	82
Глава 6. Исследование вторичной структуры конъюгатов коротких пептидов.....	86
Глава 7. Исследование биораспределения и устойчивости комплексов <i>in vivo</i> .....	90
Глава 8. Сравнение комплексов [ <sup>152</sup> Eu]Eu-DOTA-P4 и [ <sup>161</sup> Tb]Tb-DOTA-P4 .....	95
8.1. Мечение DOTA-P4 катионами <sup>161</sup> Tb <sup>3+</sup> .....	96
Выводы.....	98
Список литературы .....	99
Приложение .....	113

## Список условных обозначений и сокращений

РФЛП – радиофармацевтический лекарственный препарат

ТСХ (TLC) – тонкослойная хроматография

ВЭЖХ (HPLC) – высокоэффективная жидкостная хроматография

АК - аминокислоты

SST – соматостатин

SSTR – рецептор соматостатина

GEP - гастроэнтеропанкреотические (опухоли)

NET (НЭО) – нейроэндокринные опухоли

FDA – Food and Drug Administration

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

КЧ – координационное число

PRRT – пептид-рецепторная радионуклидная терапия

ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РЗЭ – редкоземельные элементы

ЖСС – жидкостная сцинтилляционная спектроскопия

SASA (solvent accessible surface area) – площадь поверхности, доступная растворителю

GMP (good manufacture practice) – надлежащая производственная практика

Ln – лантаноид

RMSD (root mean square deviation) – среднеквадратичное отклонение

## Введение

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. 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, **цель** данной диссертационной работы - определение условий получения и перспективности применения комплексов конъюгатов коротких пептидов с

радионуклидами  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{161}\text{Tb}$  ( $^{152}\text{Eu}$ ) и  $^{207}\text{Bi}$  в качестве компонентов радиофармпрепаратов. Радионуклиды  $^{152}\text{Eu}$  и  $^{207}\text{Bi}$  использовались как долгоживущие аналоги медицинских радионуклидов тербия и альфа-излучающих радионуклидов висмута-212,213 соответственно. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение оптимальных условий синтеза меченых комплексов: 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*.

#### **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-DOТА для применения в качестве биологического вектора в составе радиофармпрепарата.
2. Впервые получены данные о сродстве пептидных конъюгатов с положением хелатора у С-конца аминокислотной цепи к рецепторам соматостатина на поверхности клеток нейробластомы человека.
3. Впервые изучен тип вторичной структуры исследуемых пептидных конъюгатов.

#### **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 DOТА-Р (Р=Р1, Р2, Р3, Р4) в различных средах биологического значения, а комплекс [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOТА-Р4 устойчив и *in vitro*, и *in vivo*;
2. Перенос хелатора от N-конца к С-концу аминокислотной цепи повышает стерическую доступность хелатора для катиона в растворе. Конъюгаты коротких пептидов с положением хелатора у С-конца аминокислотной цепи демонстрируют сродство к рецепторам соматостатина на поверхности клеток IMR-32, при этом

добавление дополнительного органического фрагмента приводит к увеличению неспецифичного 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.

### **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 и висмута.

2. 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.

### **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.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора охватывал критический обзор литературных данных, подбор методик анализа методами ТСХ и 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.

### **Апробация результатов**

Основные результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, Россия, 3-8 октября 2022); X Российская конференция с международным участием «Радиохимия-2022» (Санкт-Петербург, Россия, 26-30 сентября 2022); IV Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтические препаратов РАДИОФАРМА-2021» (Переславль-Залесский, Россия, 30 сентября - 3 октября 2021), XI International Conference on Chemistry for Young Scientists "Mendeleev 2019" (Санкт-Петербург, 9-13 сентября 2019), III Международная научно-практическая конференция "Радиофарма-2019" (Москва, 18-21 июня 2019), International Symposium on Metal Complexes (ISMEC) 2019 (Дебрецен, Венгрия, 11-14 июня 2019), The Fifth International Scientific Conference ADVANCES IN SYNTHESIS AND COMPLEXING (Москва, 22-26 апреля 2019), The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research (Москва, 24-25 сентября 2018), IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018» (Санкт-Петербург, 17–21 сентября 2018).



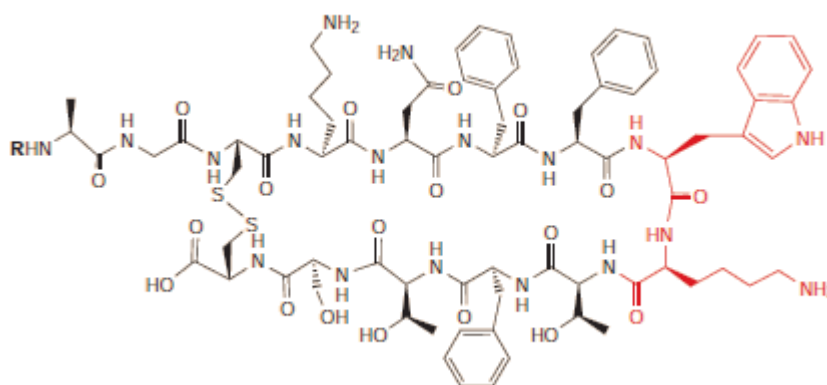
## **Публикации**

Всего по материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, 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.

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1. Соматостатин

Соматостатин (SST), или фактор ингибирования высвобождения соматотропина, представляет собой циклический пептидный гормон, впервые выделенный в 1968 г. из гипоталамуса овцы и фактически идентифицированный в 1973 г [1]. Первоначально он рассматривался как ингибитор гормона роста, но на сегодняшний день известно, что он участвует в подавлении многочисленных метаболических процессов, связанных с нейротрансмиттерами, гормонами (например, гормоном роста, инсулином, глюкагоном и гастрином), а также модулирует экзокринные секреты (например, желудочные кислоты и ферменты поджелудочной железы). Соматостатин встречается в двух активных формах, состоящих из разного количества аминокислот (АК): SST-28 и SST-14 (Рис.1). Хотя SST-14 преобладает в центральной нервной системе, а SST-28 - в пищеварительном тракте, распределение этих двух биологически активных форм схоже.



SST-14: R = H

SST-28: R = H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-

Рис.1. Общая формула гормона соматостатина.

В начале 1990-х годов одновременно с исследованиями связывающих свойств и механизмов действия соматостатина были обнаружены его пять подтипов рецепторов (SSTR1 - SSTR5) [2]. Эти подтипы принадлежат к семейству рецепторов, связанных с G-белками, и их длина варьируется от 364 до 418 АК. Все они имеют семь спиралей в трансмембранном домене, и большая часть различий между подтипами обнаруживается во внеклеточном (N-конце) и внутриклеточном (C-конце) участках. SSTR-1, -3, -4 и -5 имеют один подтип, в то время как для SSTR2 существуют два варианта, называемые SSTR2A и SSTR2B. SSTR1 - 4 связывает SST-14 и -28 с очень высокой концентрацией (в

наномолярном порядке), тогда как SSTR5 показывает активность в 5–10 раз выше, но только для SST-28. Рецепторы соматостатина широко распространены в здоровых тканях с отчетливой экспрессией по всему телу так, что в одной ткани возможно найти несколько подтипов.

Эффекты соматостатина выражаются через разные сигнальные пути [3,4]. После каскада реакций это приводит, с одной стороны, к ингибированию роста опухоли (действие на секрецию гормонов) и блокированию пролиферации за счет активации различных тирозинфосфатаз (антипролиферативное и проапоптотическое действие), но также к ингибированию секреции факторов роста, таких как гормон роста или IGF-1, играющих главную роль в ингибировании роста опухоли (антиангиогенное действие) [5].

За последние 20 лет понимание явлений, связанных с активацией SSTR, расширилось благодаря многочисленным трансляционным и клиническим исследованиям, которые привели к разработке новых терапевтических возможностей [6]. Использование аналогов SST продемонстрировало реальную эффективность при лечении различных патологий: акромегалии (выработка избытка гормона роста), панкреатита, осложнений, связанных с диабетом и ожирением (например, ретинопатии или нефропатии), действия на воспаление и в некоторых случаях на боль [4,7].

Однако SSTR и аналоги SST в основном известны своим присутствием и ролью в обнаружении и лечении некоторых солидных опухолей. Опухолевые клетки и перитуморальные сосуды экспрессируют подтипы рецепторов, плотность которых зависит от типа опухоли (таблица 1) [8,9]. Для тех типов, у кого наблюдается избыточная экспрессия SSTR, таких как аденомы гипофиза, гастроэнтеропанкреатические нейроэндокринные опухоли (GEP-NET) или другие виды рака (например, лимфомы, мелкоклеточный рак легких и т.д.) становится возможным нацеливание с помощью аналогов SST [10]. В частности, для нейроэндокринных опухолей (категория опухолей, где SSTRs наиболее выражены), аналоги SST в настоящее время используются в повседневной клинической практике [11,12].

Таблица 1. Распространенность разных типов SSTR среди раковых заболеваний.

Тип опухоли	SSTR экспрессия	Литература
Карцинома груди, лимфома	SSTR2	[9]
Медуллобластома, менингиома, нейробластома, параганглиома, мелкоклеточный рак легких	SSTR2	[13]
Эпендимома	SSTR1, SSTR5	[9]
Инсулинома	SSTR1, SSTR2, SSTR3	[13]
Карцинома простаты	SSTR1	[13]
Феохромоцитома	SSTR1, SSTR2	[13]

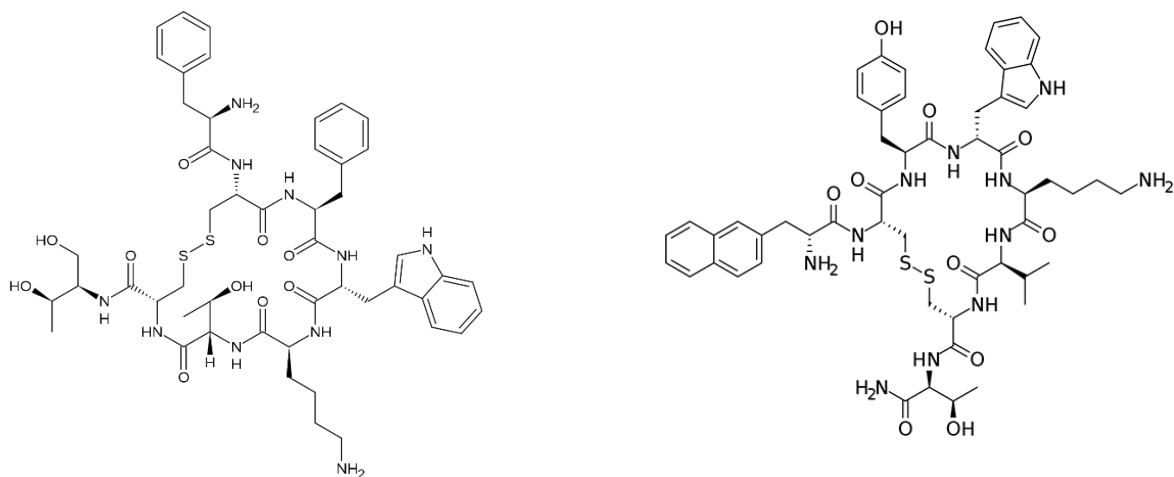
### *1.2. Пептидные аналоги соматостатина*

Соматостатин имеет короткий биологический период полураспада в организме (от одной до трех минут), поскольку он быстро разлагается пептидазами, обнаруженными в плазме и тканях [14]. В связи с этим, его количество, присутствующее в кровотоке, чрезвычайно низкое (от 14 до 32,5 пг/мл). Данный период полувыведения считается ограничивающим фактором для возможных клинических применений соматостатина, поэтому в кратчайшие сроки были разработаны аналоги SST с улучшенными метаболическими свойствами, а именно более длительным периодом полураспада (от 1,5 до 12 часов) [2,4,7]. Чаще всего это молекулы гексапептида или октапептида, которые включают биологически активное ядро нативного соматостатина (последовательность аминокислот). Исследования корреляции структура-активность показали, что последовательность Phe<sup>7</sup>-Trp<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Thr<sup>10</sup> в форме β-поворота (β-петли) необходима для сохранения биологической активности. Остатки Trp<sup>8</sup> и Lys<sup>9</sup> являются фармакофором, то есть принципиально важны и присутствуют во всех аналогах SST, тогда как Phe<sup>7</sup> и Thr<sup>10</sup> могут подвергаться некоторым заменам, с условием сохранения конформации. Среди аналогов соматостатина есть две основные категории: агонисты (вещества, способные активировать рецепторы соматостатина) и антагонисты (молекулы, которые взаимодействуют с рецепторами соматостатина и блокируют или снижают физиологический эффект агониста). Также важно отметить, что аналоги соматостатина имеют разное сродство к разным подтипам рецепторов [2].

Для преодоления терапевтического ограничения SST-14 (очень короткий период полувыведения из плазмы) и поиска более стабильных аналогов, изначально наметились два подхода. Первый был ориентирован на короткоцепочечные метаболически стабильные аналоги, обычно демонстрирующие селективность в отношении одного (или меньшинства) рецепторов SST. Ученые предполагали, что комбинирование характеристик таких стабильных аналогов уменьшенного размера со структурными модификациями в конечном итоге может привести к созданию молекул, способных к универсальному связыванию с рецепторами SST. Второй подход рассматривал более крупные аналоги SST, которые связываются с большинством рецепторов SST, но которые требуют метаболической стабилизации посредством последующих химических модификаций, включающих включение D- или N-метилованных аминокислот.

Первым аналогом пептида-агониста, одобренным FDA, был октреотид (SMS 201-995), продаваемый под названием Sandostatin® (Рис.2а). Со структурной точки зрения он содержит D-Trp и D-Phe для стабилизации  $\beta$ -петли и дисульфидный мостик ближе к ключевой последовательности для лучшей метаболической стабильности. Октреотид был введен в клиническую практику в 1987 году для лечения гормон-секретирующих аденом гипофиза и гастроэнтеропанкреатических опухолей (GEP). По своему действию октреотид подавляет секрецию таких гормонов как гормон роста, инсулин, глюкагон, гастрин, серотонин и тиреотропин. При этом для всех пациентов отмечается улучшение течения заболевания, а у некоторых больных замедляется или останавливается прогрессирование опухоли, происходит уменьшение ее размеров, а также размеров метастазов в печень. Его фармакодинамика очень похожа на нативный SST, что сделало его широко используемым в клинических испытаниях для лечения опухолей GEP [15,16]. Октреотид является типичным среди октапептидных аналогов SST в том смысле, что он демонстрирует высокоаффинное связывание с SSTR2, наряду с промежуточным сродством к SSTR3 и SSTR5.

Другой аналог ланреотид (BIM 23014, торговое название Somatuline®, Рис.2б), структура которого аналогична структуре октреотида за исключением замены Phe и Thr на Trp и Val соответственно, показал сопоставимые характеристики и также широко используется при лечении нейроэндокринных опухолей [17].



а) Октреотид/SMS 201-995/Сандостатин      б) Ланреотид/ВІМ 23014/Соматулин

Рис.2. Структурные формулы октреотида и ланреотида.

В 2005 году другой аналог, вапреотид (RC160, Рис.3), вышел под названием Sanvar® и обладал свойствами, близкими к свойствам двух предыдущих аналогов, и использовался для лечения варикозного расширения вен пищевода за счет уменьшения органного кровотока посредством подавления вазоактивного интестинального пептида и глюкагона.

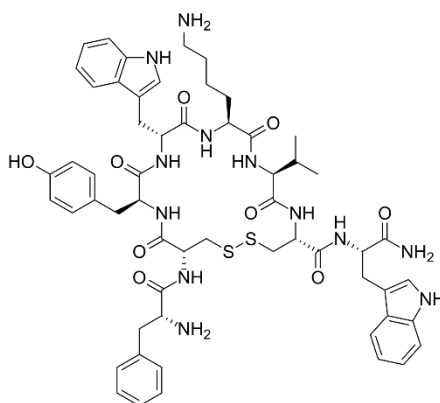


Рис. 3. Вапреотид/RC 160/Санвар.

В качестве экспериментального значения, характеризующего средство того или иного аналога к рецепторам, обычно используют параметры IC50,  $K_i$  или  $K_d$  в зависимости от типа проводимого эксперимента.  $K_d$  – константа диссоциации комплекса рецептор-лиганд, параметры  $K_i$  и IC50 пришли из химической энзимологии, где  $K_i$  – константа ингибирования или иначе константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор, IC50 – концентрация ингибитора, необходимая для снижения

ферментативной активности до половины от неингибируемого значения. Для всех этих параметров справедливо соотношение:

$$K_i = \frac{IC50}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

где [L] – концентрация лиганда. В таблице 2 приведены значения IC50 для некоторых молекул, характеризующие их сродство к каждому подтипу рецептора соматостатина. В общем случае, чем меньше величина IC50 (а также K<sub>d</sub> или K<sub>i</sub> в других типах эксперимента), тем больше демонстрируемое сродство.

Таблица 2. Значения IC50 (нМ) некоторых молекул к рецепторам соматостатина [18]

Молекула	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
SST-28	5,2±0,3	2,7±0,3	7,7±0,9	5,6±0,4	4,0±0,3
октреотид	>10000	2,0±0,7	187±55	>1000	22±6
ДТРА-октреотид	>10000	12±2	376±84	>1000	299±50
ДОТА-Тур <sup>3</sup> -октреотид	>10000	14±2,6	880±324	>1000	393±84
ДОТА-ланреотид	>10000	26±3,4	771±229	>10000	73±12

Дальнейшее уменьшение размера метаболически стабильных аналогов соматостатина было достигнуто с помощью таких соединений, как МК678 (Рис.4а). Циклогексапептид МК-678 показывает даже более избирательный профиль, чем октреотид, с более высоким сродством к SSTR2 и пониженным сродством к SSTR3 и SSTR5 [19]. Было обнаружено, что предпочтительное связывание с SSTR2 является типичным для гексапептидных аналогов соматостатина. Однако в последнее время ситуация существенно изменилась с открытием нового циклогексапептида SOM230 (пасиреотид, Рис.4б) [20]. Этот аналог включает новые функционализированные боковые цепи, такие как тирозилбензил, чтобы имитировать два остатка Phe, и гидроксипролин с дополнительным основным хвостом, имитирующим Lys<sup>4</sup> из SST-14. SOM230 является первым почти универсальным стабильным аналогом SST уменьшенного размера, который демонстрирует высокое сродство к SSTR1, -2, -3 и -5. Аналоги, демонстрирующие сильную активность в отношении большинства подтипов рецепторов соматостатина называют пансоматостатиновыми аналогами. SOM230 является сильнодействующим ингибитором гормона роста у крыс, собак и обезьян, а также у

здоровых людей и пациентов с акромегалией. Продаваемый компанией Novartis, он используется для лечения болезни Кушинга [21].

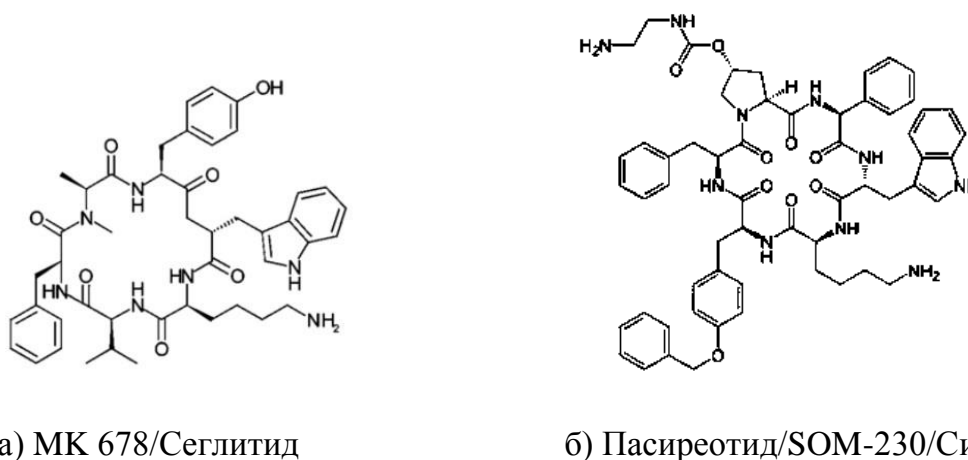
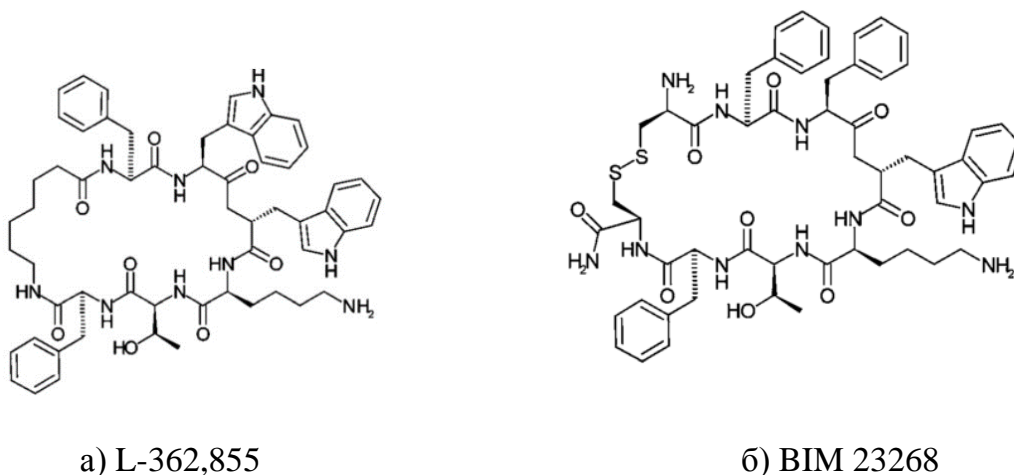
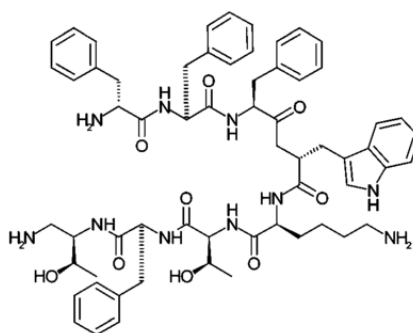


Рис.4. Структурные формулы МК678 и SOM230.

Как было сказано выше, второй подход к поиску стабильных аналогов SST был ориентирован на более крупные аналоги, чаще всего пептиды-агонисты, такие как L-362,855, который включает мостиковый элемент аминокептановой кислоты в дополнение к Phe<sup>1</sup> и Phe<sup>6</sup> и который связывается с высоким средством с SSTR2, -3 и -5 [22] (Рис.5а). Концевой Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>8</sup>-мостиковый аналог BIM 23268 (Рис.5б) и конформационно гибкий BIM 23052 (Рис.5в) с открытой цепью также обнаруживают высокое средство ко множеству рецепторов SST. Однако стабильность этих аналогов имеет тенденцию оставаться в лучшем случае промежуточной между SST-14 и октреотидом.





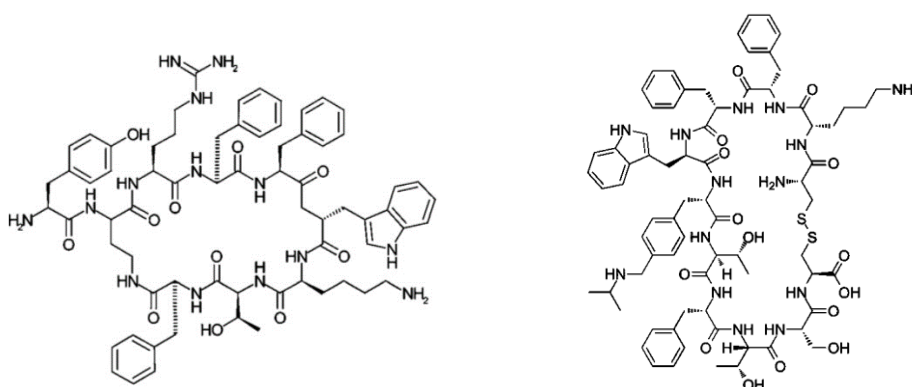


в) VIM 23052

Рис.5. Структурные формулы L-362,855; VIM 23268 и VIM 23052.

В новом подходе для создания универсального аналога нонапептидный каркас был использован в качестве основы для агониста KE108 (Рис. 6а), который связывается с наномолярным средством с SSTR1-5 и ингибирует продукцию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), однако, какие именно структурные фрагменты ответственны за универсальность средства KE108, в настоящее время неизвестно [23].

Важно отметить, что подходы к разработке селективных аналогов также могут быть основаны на структурах SST-14 или октапептида - например, ундекапептид CH-275 (Рис.6б) включает 4-(N-изопропил)-аминометилфенилаланин в  $\beta$ -повороте и показывает высокоаффинное связывание с SSTR1 и умеренное средство к SSTR3, что особенно интересно, учитывая, что SSTR1 структурно больше схож с SSTR4, чем с SSTR3 [24]. Обоснованием этого подхода является то, что введение конформационных ограничений, вызванных включением N-метилованных аминокислот, ограничит возможные биологически активные конформации SST-14, тем самым обеспечивая селективность к SSTR1.



а) KE108

б) CH-275

Рис.6. Структурные формулы KE108 и CH-275.

Адамантановые циклопептиды, такие как SDZ 222-100 (Рис.7), представляют собой новый тип ультракоротких аналогов SST-14. SDZ 222-100 включает фармакофор D-Trp-Lys в сочетании с адамантаном в качестве жесткого мостикового звена и избирательно связывается с SSTR2 ( $K_d = 63$  нМ) и ингибирует секрецию гормона роста как *in vitro*, так и у крыс [4].

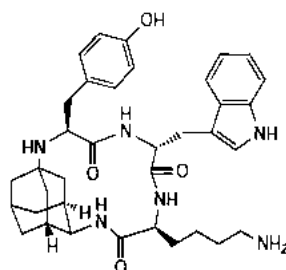


Рис. 7. SDZ 222-100.

Еще одной многообещающей серией новых соединений являются так называемые  $\beta$ -пептиды (Рис.8), поскольку они состоят из  $\beta$ -аминокислот (амино-группа находится у  $\beta$ -углерода), которые также имеют пониженное количество амидных связей в основной цепи и могут служить потенциальными каркасами для селективных агонистов соматостатина [25]. Этот подход аналогичен стратегии на основе адамантана, и его можно рассматривать как промежуточное звено между пептидными и непептидными аналогами, поскольку он обеспечивает устойчивость к протеолизу и использует методы синтеза  $\beta$ -аминокислот. Однако максимальное сродство, полученное для  $\beta$ -пептидов, до сих пор не превышало 83 нМ для SSTR4 [26]. Расширение этого подхода недавно продемонстрировало, что  $\gamma$ -пептиды с открытой цепью, содержащие только три амидные связи, проявляют умеренное сродство к SSTR1 и -5 [27].

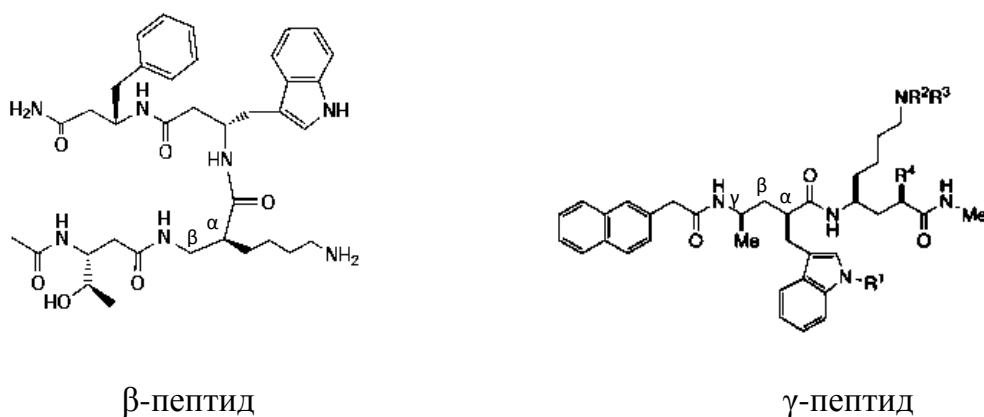
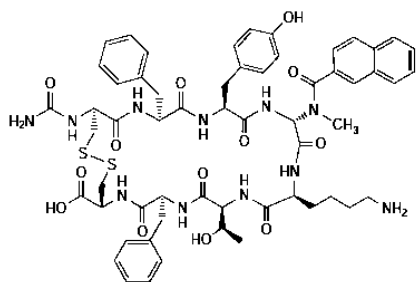


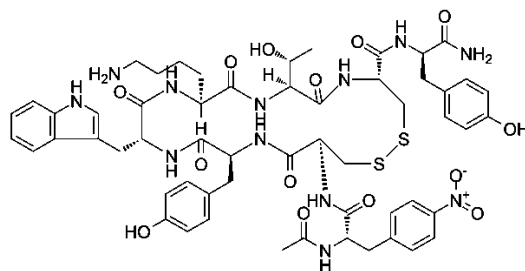
Рис.8. Примеры  $\beta$ - и  $\gamma$ -пептидов.

### 1.3. Пептидные аналоги-антагонисты

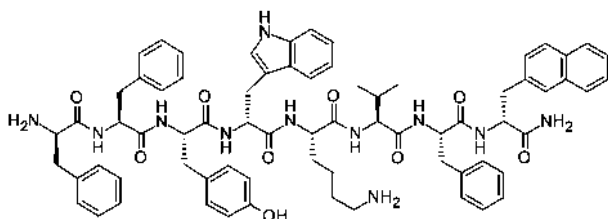
Что касается пептидных аналогов-антагонистов, то широкий спектр соединений на основе октапептида позволил открыть несколько структур, которые могут блокировать этот вид рецепторов. Первым антагонистом, описанным в литературе, является CYN-154806 (Рис.9б), за ним следует sst3-ODN-8 (Рис.9а), а также нециклические модели, такие как BIM-23056 и BIM-23627 (Рис.9в и г). CYN-154806 связывается с SSTR2 с наномолярной аффинностью ( $pK_d = 8,2-8,9$ ), а также проявляет промежуточное сродство к SSTR5 [28]. Октапептид sst3-ODN-8, в котором ограничивающий конформацию N-метиламино-2-нафтоиламиноглицин заменяет триптофан в  $\beta$ -повороте, селективно и с высоким сродством связывается с SSTR3 и противодействует SST-индуцированному ингибированию накопления цАМФ [29]. BIM 23056 и BIM 23627 представляют собой интересные аналоги октапептидов с открытой цепью, которые демонстрируют различные предпочтения подтипов SST-рецепторов [30]. В частности, BIM 23056 довольно избирательно и с высоким сродством связывается с SSTR5, тогда как BIM 23627 показывает самое высокое сродство (6,4 нМ) к SSTR2 и умеренное сродство к SSTR3 и -5. Возможные показания, которые можно лечить антагонистами соматостатина со сродством к SSTR2, могут включать нарушение секреции гормона роста, хотя до сих пор такие соединения не нашли применения в клинике.



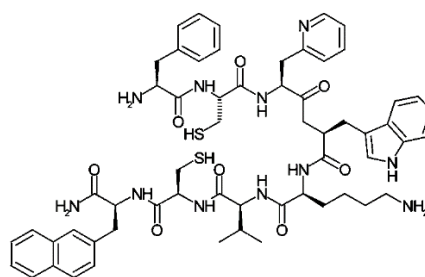
а) sst3-ODN-8



б) CYN-154806



в) BIM 23056



г) BIM 23627

Рис.9. Структурные формулы sst3-ODN-8, CYN-154806, BIM 23056 и BIM 23627.

#### 1.4. Непептидные аналоги соматостатина

Среди аналогов соматостатина разрабатываются и непептидные соединения [31]. К непептидным молекулам в данном случае относят соединения, не включающие пептидные связи, либо не состоящие из стандартных аминокислот. Эти агонисты и антагонисты (разной степени селективности) составляют очень многообещающую область химии аналогов SST, в частности, из-за их фармакологических, фармакокинетических и физико-химических свойств. Этот тип соединений может иметь более высокое сродство и/или селективность в отношении определенных подтипов рецепторов соматостатина, чем большинство пептидных аналогов. Таким образом, они могут предоставить дополнительную информацию о точной роли каждого из этих подтипов [4,7].

Непептидные аналоги-агонисты, такие как L-054,264 и L-054,522 (Рис.10а и б), которые связываются с высокой селективностью и сродством к SSTR2, были разработаны методами комбинаторной химии [32]. L-054,522 связывается с SSTR2 с кажущейся константой диссоциации 0,01 нМ и по меньшей мере 200-кратной селективностью при оценке против четырех других подтипов рецепторов соматостатина. Этот агонист оказывает сильное ингибирующее действие на высвобождение гормона роста как *in vitro* с использованием первичных клеток гипофиза крыс, так и *in vivo* при инфузии крысам со скоростью 50 мкг/(кг·час). Подход с использованием методов комбинаторики позволил идентифицировать полный набор непептидных агонистов с выраженной селективностью и сродством к каждому из подтипов рецепторов SST [33,34]. Примером является L-779,976 (Рис.10в), высокоселективный к SSTR2 ингибитор гормона роста и высвобождения глюкагона в тест-системах на грызунах; L-803,087 (Рис.10г), соединение с высокой SSTR4-селективностью (0,7 нМ); и L-817,818 (Рис.10д), которое является селективным в отношении SSTR5 и ингибирует секрецию инсулина в клетках поджелудочной железы мыши. Важное фармакокинетическое улучшение SSTR2-селективных непептидных агонистов было достигнуто за счет циклизации ациклических предшественников мочевины в основной цепи. Этот путь привел к получению непептидного агониста SST (Рис.10е), который демонстрирует высокоаффинное связывание с SSTR2 ( $K_i = 8,5$  нМ), а также 64% пероральной биодоступности для крыс [35].

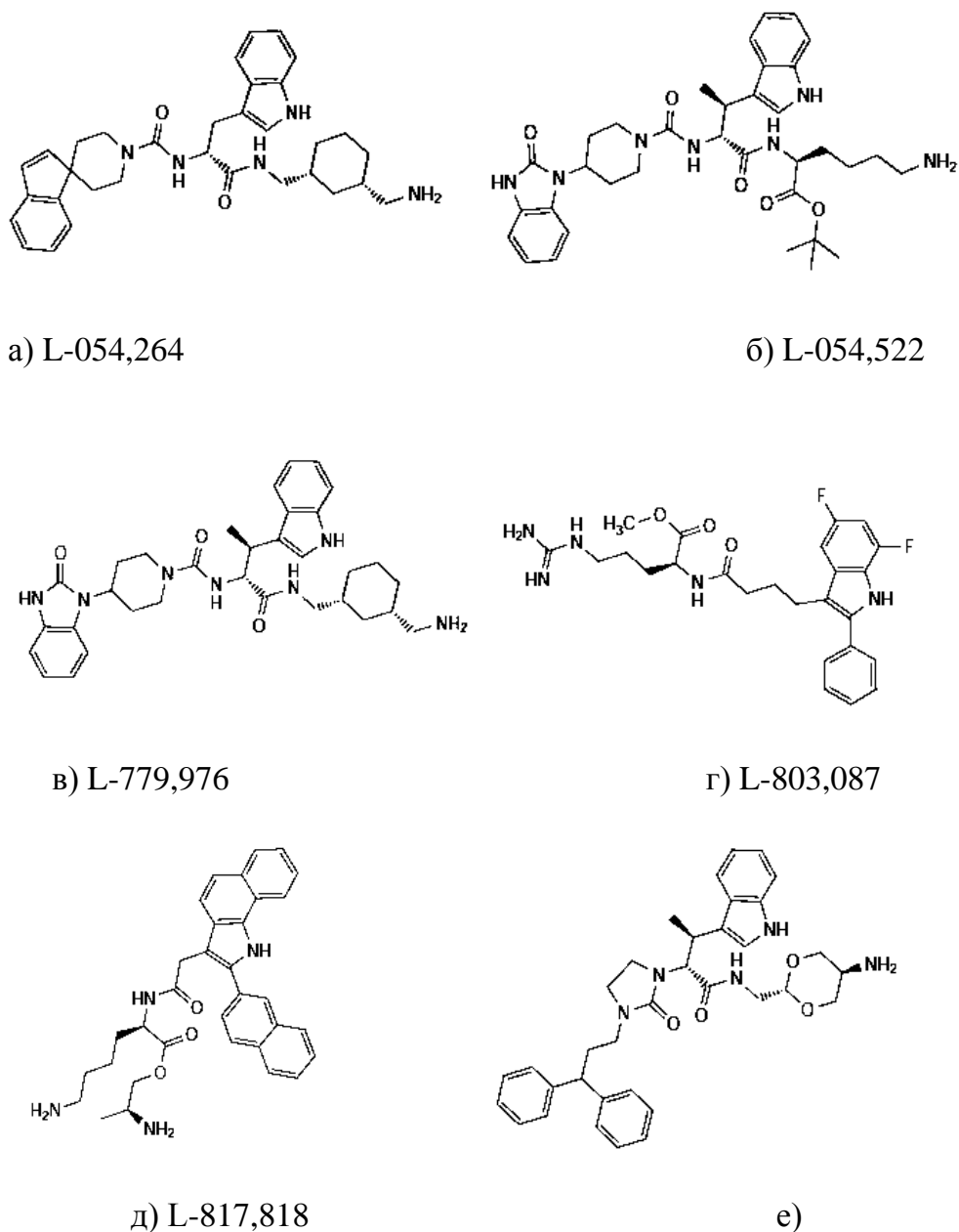


Рис.10. Структурные формулы непептидных аналогов-агонистов.

Дальнейший прогресс был достигнут в области SSTR4-селективных лигандов. Новаторская работа с моносахаридами в качестве каркасов привела к созданию аналогов SST с новым непептидным остовом [36]. Полученный из пиранозы частичный агонист (Рис.11а) показал промежуточное сродство к SSTR4 [36,37]. Наиболее эффективное соединение в серии пептидомиметиков на основе глюкозы связывается с наномолярным сродством с SSTR4 ( $K_i = 53$  нМ) [38]. Селективный агонист к SSTR4 NNC 26-9100 (Рис. 11б), который содержит основную цепь тиомочевины с боковыми имидазольными, бензильными и пиридилными звеньями фармакофоров, показал  $K_i = 6$  нМ к SSTR4, а

также ингибирующее действие на образование цАМФ в клетках, трансфицированных SSTR4 [39].

Еще один миметик SST (Рис. 11в), конформационно ограниченный девятичленный циклический тиоэфир, также связывается с SSTR4 со значением  $IC_{50} = 41$  нМ и с аналогичным сродством к SSTR5, что представляется неожиданным ввиду различий в связывании, показанных для рецепторов SSTR1 и SSTR2 [40]. Такие соединения могут быть важными фармакологическими инструментами для раскрытия все еще недостаточно определенной роли SSTR4 в организме.

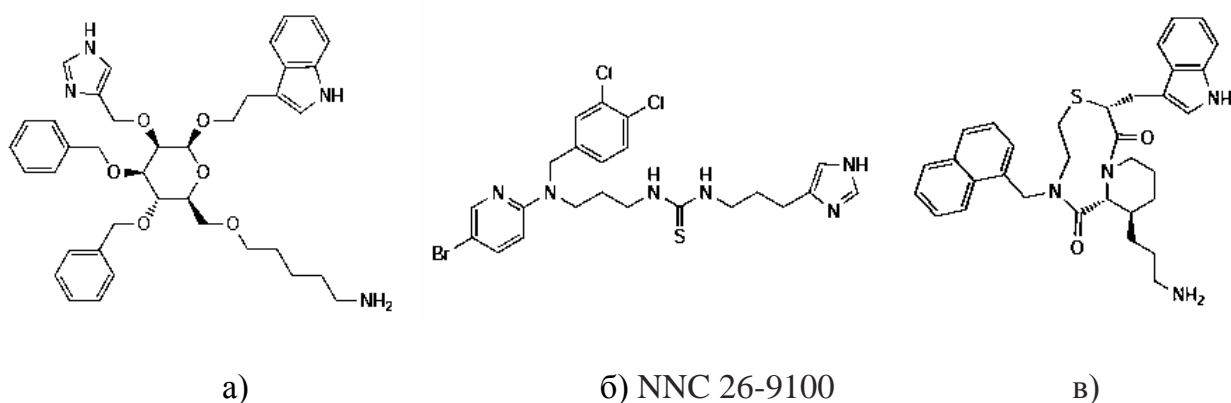


Рис.11. Структурные формулы непептидных аналогов-агонистов.

### 1.5. Непептидные антагонисты соматостатина

Селективные непептидные антагонисты рецепторов SST могут предоставить дополнительную информацию о роли каждого подтипа SSTR. Для нового антагониста SRA-880 (Рис. 12а) было продемонстрировано, что такие соединения могут сочетать преимущества пероральной биодоступности с различными терапевтическими возможностями, например, при неврологических расстройствах [41]. SRA-880 разработан на основе октагидробензохинолина. Этот селективный антагонист с высоким сродством к рецептору SSTR1 показал активность в поведенческих тестах на тревожность, депрессию и биполярные расстройства. В пероральных дозах 0,01–30 мг/кг SRA-880 снижает агрессивное поведение мышей, не вызывая седативных эффектов или ухудшая двигательную функцию. Первый SSTR3-селективный непептидный антагонист BN-81674 (Рис. 12б) из ряда производных тетрагидро-β-карболина обладал  $K_i = 0,92$  нМ к SSTR3, что в 10000 раз больше по сравнению с другими подтипами [42]. Это соединение действует как конкурентный антагонист, блокируя опосредованное соматостатином ингибирование накопления цАМФ в клетках CHO-K1, экспрессирующих SSTR3 ( $IC_{50} =$

0,84 нМ). Антагонисты SSTR3 были предложены в качестве потенциальных антиапоптотических агентов.

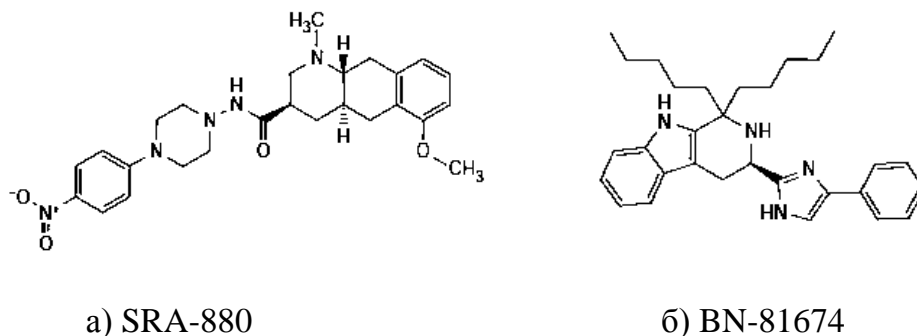


Рис.12. Структурные формулы непептидных аналогов-антагонистов.

### 1.6. Ультракороткие пептидные аналоги

Одной из современных тенденций в области исследования пептидных противоопухолевых препаратов является синтез и изучение цитотоксической активности ультракоротких аналогов соматостатина. Исследования последних лет показали, что более короткие пептиды (4-5 аминокислот) могут обладать сопоставимым с октреотидом физиологическим действием. Так, ряд новых производных пентапептида, Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-OMe, при сравнительных исследованиях на животных обладали той же противоопухолевой активностью, что и сандостатин [43]. В связи с этим, в работе [44] был создан простой и масштабируемый способ получения пептида H-Phe-D-Trp-Lys( $\epsilon$ -Boc)-Thr-OMe, который может выступать в качестве прекурсора для синтеза пентапептидных аналогов SST. Предложенный метод отличается простотой и минимальным количеством стадий, что позволяет получать целевой тетрапептид в полупромышленном масштабе.

Дальнейшие исследования коротких пептидов привели к синтезу других пентапептидных аналогов, а также модификациям структуры уже изученных пептидов. Такими модификациями являются введение защитных групп и различных фрагментов, что в свою очередь способствует повышению метаболической устойчивости и увеличению продолжительности действия таких препаратов. Так был синтезирован пентапептид Boc—Cys(Boc)—Phe—D-Trp—Lys(Boc)—Thr—NHR, проявлявший цитотоксическую активность на некоторых линиях опухолевых клеток [45]. Введением в данную структуру фрагмента (R)-1,3-тиазолидина были также получены пентапептидные производные соматостатина вида: Boc-Thz-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr-OMe, где Thz – (R)-

1,3-Тиазолидин-4-карбоновая кислота (Рис.13). Тиазолидин можно рассматривать как N,S-замещенный цистеин. Такой вариант аналога цистеина выбран, поскольку различные «псевдопролины» успешно использовались в синтезе пептидов и пептидомиметиков для поиска лекарственных препаратов [46]. Замена пролина или цистеина в пептидных лекарственных препаратах на Thz приводит к увеличению ингибирующей способности по отношению к гормону роста примерно в 2 раза. Также тиопролин-содержащие пептиды обладают большей активностью по сравнению с природными аналогами и показывают высокую цитотоксическую активность на клеточных линиях опухолей человека, экспрессирующих рецепторы соматостатина [47–49]. Некоторые противоопухолевые трипептиды, содержащие тиопролин, значительно подавляли рост erbB-2-трансформированных NIN3T3 опухолевых клеток [50]. Исследования по корреляции структура-активность соединений блокаторов кальциевых каналов показали, что введение в дипептид N-Вос-тиазаолидин-4-карбонильной группы значительно усиливает ингибирующий потенциал и увеличивает селективность по отношению к N-типу кальциевых каналов [51]. Замена пролина на 5,5-диметилтиазаолидин-4-карбоновую кислоту в ангиотензине II, ключевом пептиде в регуляции артериального давления, привело к пептидомиметику-агонисту с активностью на 39% большей, чем у природного пептида [52]. Пентапептидные аналоги соматостатина, содержащие тиазаолидиновый фрагмент, показали высокую цитотоксическую активность на клеточных линиях опухолей человека, экспрессирующих рецепторы соматостатина: аденокарциноме молочной железы MCF-7, карциноме толстой кишки HCT-116 и аденокарциноме простаты PC-3 [49]. Кроме того, известны производные тиазаолидин-4-карбоновой кислоты, обладающие противоопухолевой активностью [53,54].

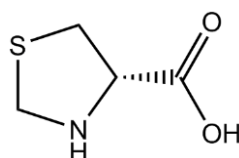


Рис.13. Аминокислота Thz – (R)-1,3-Тиазолидин-4-карбоновая кислота.

В работе [55] проводилось сравнение биологической активности пентапептидных аналогов с октапептидными октреотидом и сандостатином. Результаты показали, что в исследуемых концентрациях ( $C_{max} = 9 \cdot 10^{-4}M$ ) в отличие от пентапептидов, ни октреотид, ни сандостатин не проявляют цитотоксическую активность.



При синтезе коротких пептидов выбор защитных групп и модифицирующих фрагментов может играть решающую роль в случае установления цитотоксической активности. Так в работе [56] были исследованы семь пептидов, сохраняющие в себе основную последовательность аминокислот, но содержащие различные защитные группы и цитотоксические агенты: тиазолидина (Thz), нафтила, ремантадина, хлорфенацила (Thp) и цифелина (Ac-Sar-Val). В работе исследовались следующие пептидные последовательности:

1. Boc-Cys(Thp) – Phe – D-Trp – Lys(ClPhe) – Thr-OMe
2. Boc-Thz-Phe – D-Trp – Lys(Boc) – Thr-Ome
3. Boc-Cys(Boc) – Phe – D-Trp – Lys(Boc) – Thr-NH-naphthyl
4. ClPhe – Cys(Thp) – Phe – D-Trp – Lys(Z) – Thr-OMe
5. Z-Phe – D-Trp – Lys(Boc) – Thr-remantadyl
6. Ac-Sar-Val – Cys(Thp) – Phe – D-Trp – Lys(Z)- Thr-OMe
7. Boc-Phe – D-Trp – Lys(Ac-Sar-Val) – Thr-OMe

Из исследованных семи пептидов только два (1 и 7) проявили активность против меланомы и аденокарциномы, экспрессирующих соматостатиновые рецепторы 1-го, 2-го и 5-го подтипов. Данные результаты свидетельствуют о том, что модификации структуры пептидов защитными группами и цитотоксическими фрагментами также влияют на сродство данных молекул к целевым рецепторам.

### ***1.7. Макроциклический хелатор DOTA***

Как было сказано выше, биологический вектор в составе радиофармпрепарата отвечает за направленную доставку радионуклида к очагу поражения, при этом для эффективного связывания радиоактивных катионов металлов в комплекс используются циклические и ациклические бифункциональные хелатирующие агенты.

DOTA (Рис.14а) является одним из основных хелаторов в радиофармацевтической химии и по праву один из нынешних «золотых стандартов» для ряда радионуклидов, таких как  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{86/90}\text{Y}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  и  $^{44/47}\text{Sc}$  [57]. DOTA также широко исследуется с  $^{67/68}\text{Ga}$ , но было отмечено, что комплекс Ga-DOTA менее стабилен по сравнению с комплексом со своим более миниатюрным макроциклическим аналогом NOTA (Рис.14б). Однако замечено, что даже если один хелатор образует более устойчивый комплекс с металлом (например, NOTA по сравнению с DOTA для  $^{68}\text{Ga}$ ), это не является главным критерием при выборе хелатора. Так, несмотря на то, что NOTA образует более устойчивый

комплекс с  $^{68}\text{Ga}$ , из-за различий в заряде и физических свойствах (заряженный комплекс с DOTA и нейтральный с NOTA), при работе с определенными векторами предпочтение отдается DOTA. Существенными недостатками DOTA являются медленная кинетика комплексообразования при нормальных условиях и необходимость нагрева до температур 90-105°C.

В таблице 3 приведены некоторые примеры комплексов M-DOTA и их характеристики.

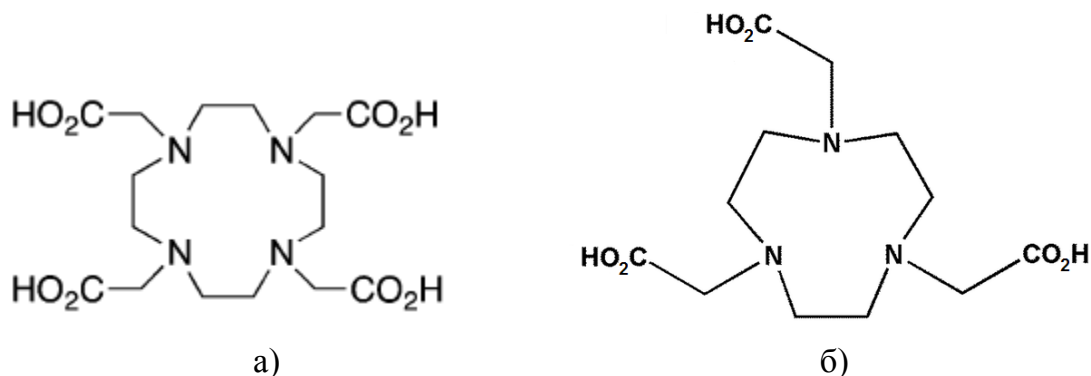


Рис.14. Химические формулы хелаторов а) DOTA, б) NOTA.

Таблица 3. Примеры комплексов с DOTA и их характеристики.

M	lg K <sub>ML</sub>	Координационный полиэдр	Литература
Cu <sup>2+</sup>	22,2	Искаженный октаэдр	[58]
Ga <sup>3+</sup>	21,3	Искаженный октаэдр	[59]
Sc <sup>3+</sup>	27	Квадратная антипризма	[60]
Eu <sup>3+</sup>	26,2; 28,2	Квадратная антипризма	[61,62]
Tb <sup>3+</sup>	28,6	Квадратная антипризма	[62]
Lu <sup>3+</sup>	25,9; 29,2	Квадратная антипризма	[61,62]
Y <sup>3+</sup>	24,9	Квадратная антипризма	[63]
Bi <sup>3+</sup>	30,3	Квадратная антипризма	[64]
Ac <sup>3+</sup>	19,5; 16,4	Квадратная антипризма	[65,66]

DOTA имеет 8 координационных центров (4 атома азота и 4 карбоксильные группы) и в случае катионов РЗЭ, проявляющих координационные числа 8-9, строение образующихся комплексов представляет собой квадратную призму или антипризму (КЧ8, для катионов небольшого размера: Sc<sup>3+</sup>, Lu<sup>3+</sup>) с шапочной молекулой воды (КЧ9, для относительно крупных катионов: Y, La, Eu) (Рис.15) [67].

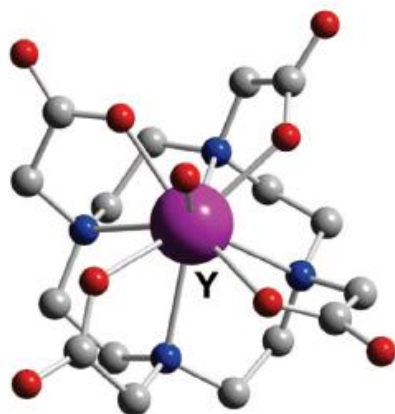
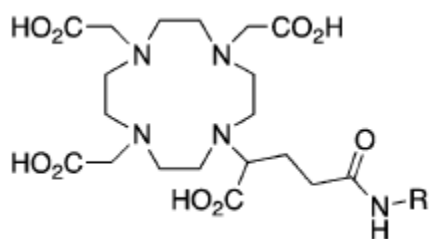


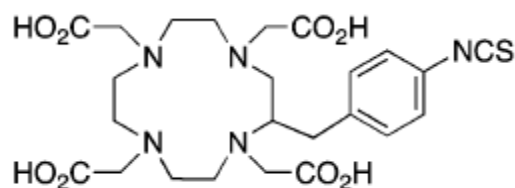
Рис.15. Комплекс Y-DOTA·H<sub>2</sub>O [63].

При разработке новых бифункциональных хелаторов или модификации уже существующих, необходимо следить за сохранением оригинальной координационной сферы комплексообразователя. В одном из подходов используют один из остатков карбоновой кислоты в качестве сайта для конъюгации с биологическим вектором, блокируя его таким образом для координации металла (карбонильная группа амида координирует слабее). Решить эту проблему можно с использованием DOTAGA (Рис.16а) и различных изотиоцианатных производных DOTA (Рис.16б-г), которые осуществляют биоконъюгацию с помощью боковой углеродной цепи. Эти производные сохраняют максимально возможную дентатность (8), а также проявляют схожую термодинамическую и кинетическую стабильность с исходной DOTA [68].

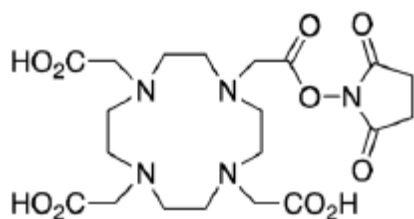
а) DOTAGA



б) p-SCN-Bn-DOTA (C-DOTA)



в) DOTA-NHS-ester



г) DOTAGA-anhydride

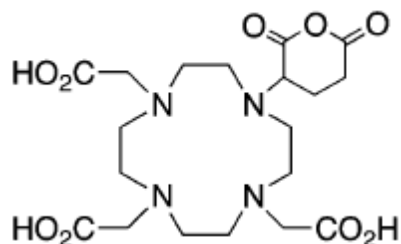


Рис.16. Производные DOTA.

Однако для некоторых катионов выбор DOTA не является оптимальным. Так DOTA успешно использовалась с  $^{212}\text{Pb}$ , однако кинетика связывания и устойчивость образуемого комплекса не были достаточными. Замена карбоксильных групп на амидные привела к получению хелатора TCMC, который на сегодняшний день является лучшим для  $^{212}\text{Pb}$  [69]. В свою очередь, 3p-C-DEPA представляется оптимальным хелатором для  $^{212/213}\text{Bi}$  за счет более быстрой кинетики связывания и термодинамической устойчивости в сравнении с DOTA [70] (Рис.17). При этом для  $\text{PZЭ}^{3+}$  DOTA остается золотым стандартом.

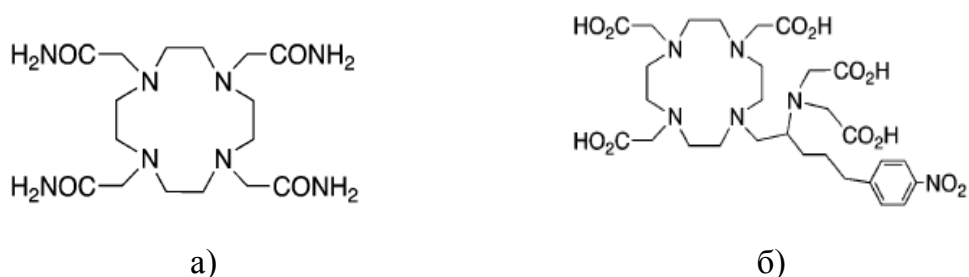


Рис.17. DOTA-производные: (а) TCMC, (б) 3p-C-DEPA.

Конъюгация октреотида и DOTA привела к созданию аналогов соматостатина, нашедших широкое применение в клинической практике в области пептид-рецепторной радионуклидной терапии (PRRT) и радионуклидной диагностики. DOTA-OC – конъюгат, полученный добавлением DOTA к октреотиду. Замена в пептидной последовательности  $\text{Phe}^3$  на  $\text{Tyr}$  привела к появлению DOTA-TOC (DOTA- $\text{Tyr}^3$ -октреотид), а замена  $\text{Tyr}^3$  на  $\text{NaI}^3$  (нафтилаланин) – к DOTA-NOC. На рис.18 представлены структурные формулы трех наиболее известных конъюгатов: DOTA-TOC, DOTA-TATE и DOTA-NOC [71]. Каждый из них сам по себе обладает сродством к SSTR2, а DOTA-NOC также к SSTR3 и SSTR5 [72].

### 1.8. Ациклические хелаторы DTPA и СНХ-А"-DTPA

DTPA (Рис.19) является примером одного из старейших и наиболее распространенных ациклических хелаторов, использующихся в радиохимии. Он может образовывать комплексы с катионами многих радионуклидов при комнатной температуре всего за несколько минут. Однако, являясь представителем первого поколения подобных хелаторов, он обладает недостаточной кинетической стабильностью образуемых комплексов в сравнении с DOTA, что делает его использование в настоящее время устаревшим. DTPA успешно использован в качестве бифункционального хелатора в

препарате OcreoScan™ ( $[^{111}\text{In}]\text{In-DTPA-октреотид}$ ), применяющегося в диагностике нейроэндокринных опухолей, а также с такими металлами как  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{86/90}\text{Y}$  [73].

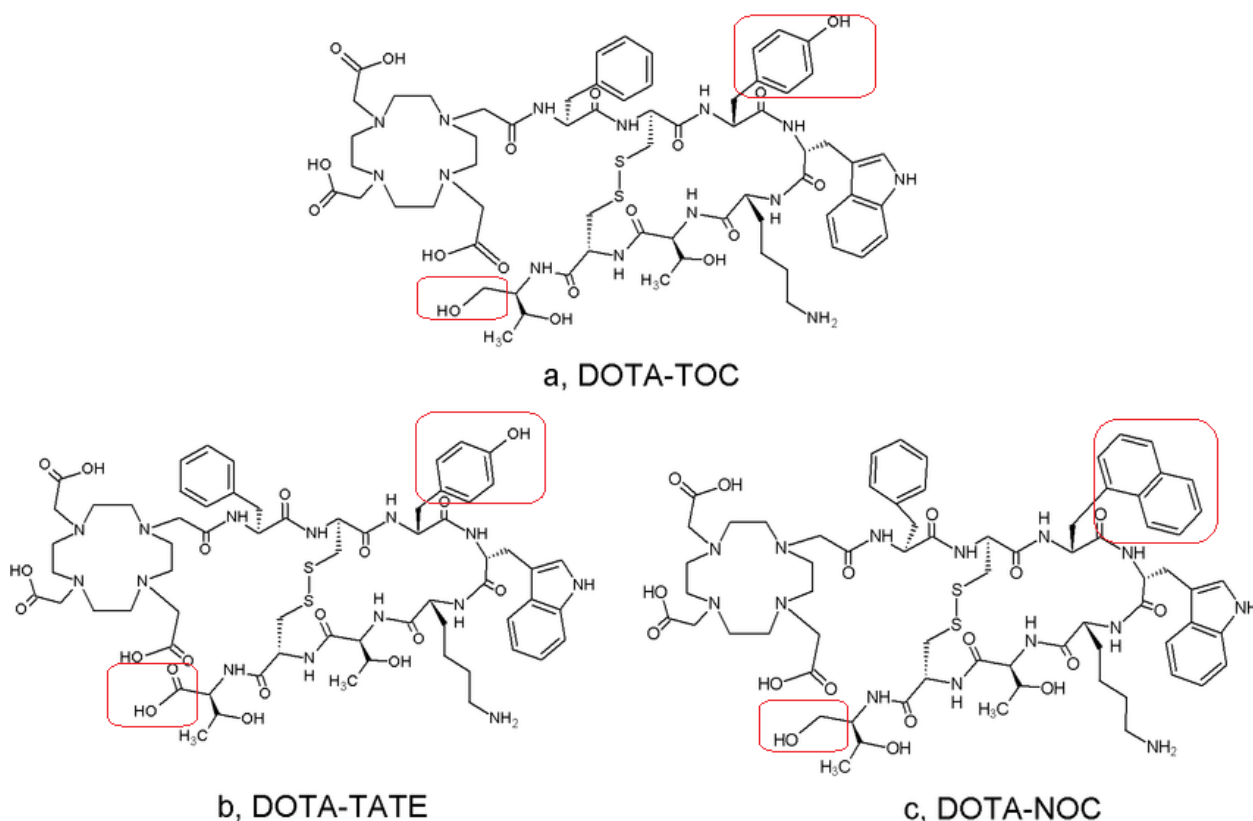


Рис.18. Аналоги октреотида, конъюгированные с DOTA: а) DOTA-TOC (DOTA-D-Phe1-Tyr<sup>3</sup>-октреотид), б) DOTA-TATE (DOTA-Tyr<sup>3</sup>-октреотат), в) DOTA-NOC (DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-октреотид), красным выделены отличия в структуре конъюгатов.

Недостатки DTPA были улучшены за счет создания новых производных, например СНХ-А''-DTPA [74]. Циклогексильный заместитель СНХ-А''-DTPA делает хелатор более жестким и обеспечивает некоторую степень предорганизации на участке связывания иона металла, повышая кинетическую инертность, но при этом снижая скорость мечения. В связи с успехом использования антител в качестве векторов, разработка ациклических хелаторов с быстрой кинетикой связывания металла без нагревания и высокими константами устойчивости является перспективной задачей. Лиганд СНХ-А''-DTPA интересен так же тем, что он имеет два хиральных атома углерода и, соответственно, четыре возможных оптических изомера. При проведении эксперимента в условиях *in vivo* комплекс с изомером СНХ-В''-DTPA оказался менее стабильным, чем с изомером СНХ-А''-DTPA, в то время как *in vitro* их стабильность была идентичной [75]. В связи с этим, использование данного хелатора в качестве компонента РФП предполагает необходимость получения и выделения предпочтительного энантиомера.

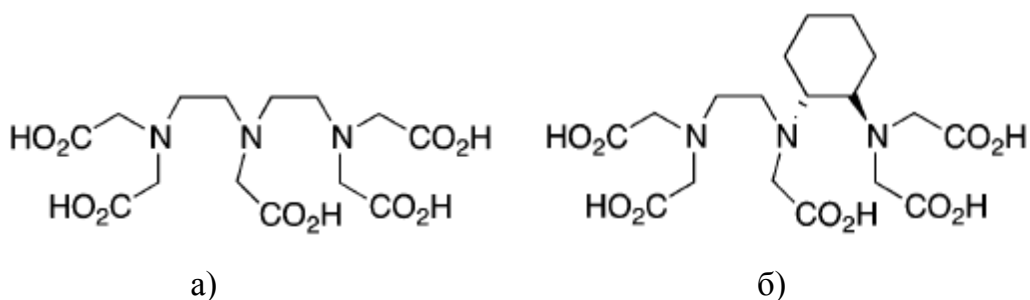


Рис.19. (а) H<sub>5</sub>DTPA и (б) CHX-A''-DTPA.

### 1.9. Первые комплексы аналогов соматостатина с радионуклидами

Первое подтверждение концепции визуализации опухолей, экспрессирующих SSTR, было выполнено с [<sup>123</sup>I-Tyr<sup>3</sup>]-октреотидом, полученным в результате реакции йодирования (электрофильного замещения) тирозина [76,77]. Это соединение продемонстрировало биологическую активность и сродство к рецепторам, аналогичные таковым у нативного SST [78]. Несмотря на очевидные достоинства данного соединения, основными его недостатками были сложная процедура мечения, значительная стоимость и, в частности, печеночный клиренс, что существенно затрудняло интерпретацию полученных изображений [77]. Чтобы преодолеть все эти недостатки, йод-123 был заменен на индий-111, который через хелатирующий агент DTPA был связан с октреотидом [73]. Исследования *in vivo* [<sup>111</sup>In-DTPA]-октреотида показали, что можно визуализировать опухоли, экспрессирующие SSTR и их метастазы, даже через 24 часа после инъекции. По сравнению с соединениями, связанными с антителами, он показывает относительно быстрый клиренс через почки, что также представляет собой огромное преимущество по сравнению с [<sup>123</sup>I-Tyr<sup>3</sup>]-октреотидом [79,80]. Это соединение было первым радиофармацевтическим препаратом, направленным на SSTR и одобренным FDA (Ostreoscan® поступил на рынок в 1994 году). Он широко использовался и долгое время считался «золотым стандартом» для визуализации нейроэндокринных опухолей, однако он обладает рядом ограничений: необходимость высокого соотношения сигнал/шум, низкое пространственное разрешение, умеренное сродство к рецепторам и, наконец, высокая энергия  $\gamma$ -излучения, что приводит к получению высокой дозы излучения пациентом. По всем этим причинам исследования в области радиофармпрепаратов для диагностики и терапии нейроэндокринных опухолей были и остаются на данный момент сосредоточены на других радионуклидах.

### 1.10. Аналоги соматостатина, меченые $^{90}\text{Y}$ , $^{177}\text{Lu}$

Иттрий-90, чистый  $\beta^-$ -эмиттер с высокой энергией испускаемых частиц ( $T_{1/2} = 64$  ч,  $E_{\beta\text{max}} = 2,28$  МэВ), и лютеций-177, эмиттер  $\beta^-$ -частиц средней энергии ( $T_{1/2} = 6,7$  дня,  $E_{\beta\text{max}} = 0,5$  МэВ) с  $\gamma$ -компонентой (208 кэВ), в настоящее время наиболее широко используются в пептид-рецепторной радионуклидной терапии. Каждый из этих двух элементов имеет свои преимущества для таргетной терапии. Частицы, испускаемые  $^{90}\text{Y}$ , обладают более высокой энергией и проникающей способностью, что является преимуществом при лечении крупных опухолей. Однако даже если излучение высокой энергии позволяет более равномерно облучать опухоль, существует очень высокий риск воздействия чрезмерной дозы излучения на соседние здоровые ткани. Со своей стороны,  $^{177}\text{Lu}$  испускает менее энергичное излучение, более подходящее для небольших опухолей. Кроме того, энергии его гамма-излучения достаточно для проведения сцинтиграфии и предварительного расчета дозовой нагрузки для сеансов терапии [81].

Первым изучаемым SST аналогом в клинике был [ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTATOC (Octreother®), и первые сеансы лечения быстро показали хорошие результаты, остановив прогрессирование опухоли [82–84]. Большинство исследований этого давно применяемого метода лечения позволили наблюдать хорошую переносимость этого препарата, при этом среди побочных эффектов отмечались только легкие (утомляемость) и в очень редких случаях несколько более серьезные (тошнота). Однако [ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTATOC показал некоторую токсичность для почек и костей, причем эти два аспекта являются факторами, ограничивающими максимально допустимую дозу для пациента. По сравнению с [ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTATOC, для [ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTATATE было продемонстрировано большее сродство к SSTR2 *in vitro* [18]. Однако для диагностики у людей наилучший контраст между почками и опухолью был обнаружен для [ $^{111}\text{In}$ ]-DOTATOC по сравнению с [ $^{111}\text{In}$ ]-DOTATATE [85], что может объяснить более широкое использование аналога DOTATOC в целом. Несмотря на это, эти два аналога обладают относительно схожими свойствами и доказали свою эффективность в качестве методов лечения, улучшающих выживаемость у некоторых пациентов с нейроэндокринными опухолями (примерно 50 месяцев по сравнению с 18 месяцами без лечения) [86].

В исследовании фазы IIА с [ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTALAN (DOTA-ланреотид, исследование MAURITIUS) было продемонстрировано более низкое поглощение опухолью по сравнению с [ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTATOC [87]. С точки зрения нескольких лет клинического

использования, PRRT с  $^{90}\text{Y}$ -меченными аналогами соматостатина, по-видимому, хорошо переносится с благоприятным долгосрочным результатом. К сожалению, исследования фазы III все еще отсутствуют [88,89].

Те же аналоги также были помечены лютецием-177. Первоначально [ $^{177}\text{Lu}$ ]-DOTATOC использовался в случаях рецидива нейроэндокринных опухолей после лечения [ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTATOC. Несмотря на удовлетворительные результаты [90], его другой аналог [ $^{177}\text{Lu}$ ]-DOTATATE оказался более перспективным, в основном из-за более значительного времени удерживания в опухоли. По этой причине октреотат (TATE) предпочтительнее октреотида (ТОС) для мечения с помощью лютеция [88,91]. Также важно отметить, что, в отличие от  $^{90}\text{Y}$ , в силу меньшей энергии испускаемых частиц случаев нефротоксичности после лечения с использованием  $^{177}\text{Lu}$  не зарегистрировано.

В 2005 г. появилась возможность совмещения этих двух излучателей для терапии при обнаружении опухолей различного размера [92]. Исходя из этого, различные комбинации лечения между четырьмя основными системами ([ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTATOC, [ $^{90}\text{Y}$ ]-DOTATATE, [ $^{177}\text{Lu}$ ]-DOTATOC и [ $^{177}\text{Lu}$ ]-DOTATATE) оказались перспективными и иногда даже более эффективными, чем с использованием только одного препарата [93,94]. Таким же образом комбинация радиофармпрепарата с немечеными аналогами соматостатина, химиотерапией, таргетной терапией и/или радиосенсибилизаторами может дополнительно улучшить эффективность и/или переносимость по сравнению с монотерапией [95,96]. [ $^{177}\text{Lu}$ ]-DOTATATE так же был исследован в III фазе на хорошо дифференцированных, неоперабельных или метастатических прогрессирующих нейроэндокринных опухолях средней кишки (исследование Netter 1). По результатам лечения в 18% случаев наблюдался значительный ответ опухоли по сравнению с 3% в группе, получавшей высокие дозы октреотида LAR («long-acting repeatable»), в сочетании со снижением риска прогрессирования заболевания или смерти на 79% [97]. После этих положительных результатов [ $^{177}\text{Lu}$ ]-DOTATATE был одобрен по этому показанию как в Европе, так и в США (препарат Lutathera®) [98]. В сочетании с визуализацией с  $^{68}\text{Ga}$  он представляет собой мощный тераностический инструмент для лечения нейроэндокринных опухолей [99].

Также  $^{177}\text{Lu}$  активно исследуется с конъюгатами на основе SSTR-антагонистов LM3 [100] и JR11 [101] (Рис.20), в том числе и на людях. Как было показано, основными преимуществами таких меченных антагонистов перед агонистами (DOTATATE,



октреотид) являются их большее накопление в опухоли, отсутствие или существенно меньшее количество побочных эффектов, а также возможность их использования у пациентов, у которых связывание SSTR и конъюгатов-агонистов не наблюдалось вообще.

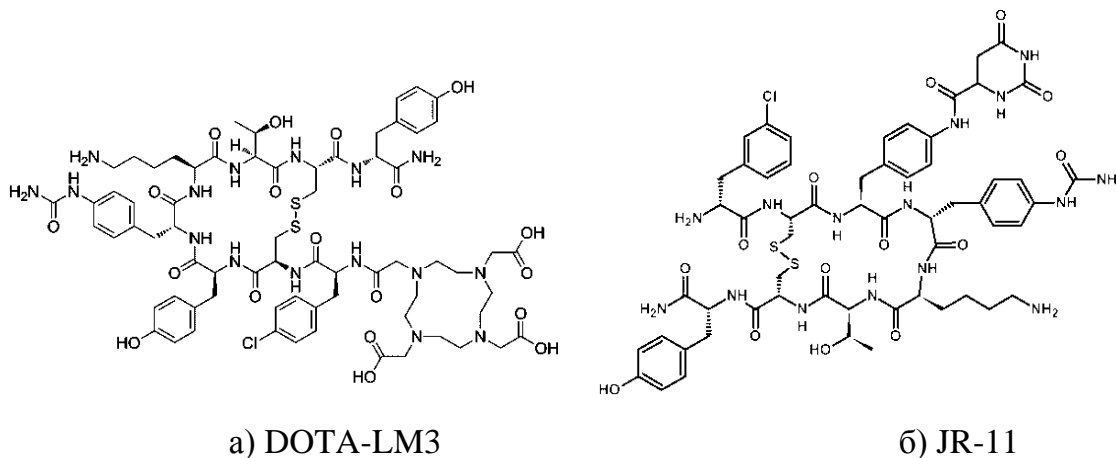


Рис.20. Структурны формулы DOTA-LM3 и JR-11.

### 1.11. Аналоги соматостатина, меченые $^{212,213}\text{Bi}$

В последнее время в области радионуклидной терапии альфа-излучатели привлекают особое внимание. Сфера их применения долгое время ограничивалась гемобластозами (новообразования, развивающиеся из гемопоэтических клеток), однако теперь она рассматриваются как потенциальные средства лечения солидных опухолей [102].

Аналоги соматостатина DOTATOC и DOTATATE, меченые  $^{213}\text{Bi}$ , продемонстрировали значительно более высокий разрушающий эффект по сравнению с  $^{177}\text{Lu}$  [103–105].  $^{213}\text{Bi}$ - и  $^{225}\text{Ac}$ -DOTATOC ( $^{213}\text{Bi}$ :  $T_{1/2} = 45,6$  мин,  $E_{\alpha} = 5,88$  МэВ;  $^{225}\text{Ac}$ :  $T_{1/2} = 9,92$  дня,  $E_{\alpha} = 5,83$  МэВ) продемонстрировали многообещающий терапевтический эффект в доклинических исследованиях на животных [106,107], тогда как  $^{213}\text{Bi}$ -DOTATATE, исследованный на моделях мелкоклеточной карциномы легкого человека и опухоли поджелудочной железы крыс, продемонстрировал большой терапевтический эффект как на малых ( $50 \text{ мм}^3$ ), так и на больших ( $200 \text{ мм}^3$ ) опухолях [108]. Первый и на сегодняшний день единственный клинический опыт применения  $^{213}\text{Bi}$ -DOTATOC включал семь пациентов с расширенными НЭО и метастазами в печени, резистентные к лечению  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC или  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC [109]. Он продемонстрировал специфическое связывание с опухолью, более низкую токсичность, чем при  $\beta$ -облучении, и частичную ремиссию метастазов, и через два года после внутриартериальной инъекции  $^{213}\text{Bi}$ -DOTATOC все семь пациентов были живы. Что касается  $^{225}\text{Ac}$ , первое

исследование на людях включало 10 пациентов с прогрессирующими НЭО после  $\beta$ -PRRT. Как и  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ -DOTATOC хорошо переносился и был эффективным [110]. Недавнее исследование  $^{225}\text{Ac}$ -DOTATATE подтвердило потенциал этих препаратов в качестве альтернативного варианта лечения пациентов, которые не поддаются терапии  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE. 32 пациента, ранее получавших  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE, прошли лечение с  $^{225}\text{Ac}$ -DOTATATE (100 кБк/кг массы тела). Ответ был получен у 24 пациентов: 9 были полностью стабильны и у 15 наблюдалась частичная ремиссия [111].

### ***1.12. Аналоги соматостатина, меченые радионуклидами Sc и Tb***

Скандий и тербий - два металла, которые относительно недавно стали интересными для тераностических применений, поскольку оба обладают как диагностическими, так и терапевтическими изотопами [112]. В исследованиях [113] и [114] DOTATOC был помечен  $^{44}\text{Sc}$  ( $T_{1/2} = 3,97$  ч,  $E_{\beta^+} = 632$  кэВ) и  $^{152}\text{Tb}$  ( $T_{1/2} = 17,5$  ч,  $E_{\beta^+} = 1140$  кэВ) и далее быстро вводился пациентам [115,116]. В течение последующих периодов наблюдения побочных эффектов не наблюдалось, и изображения оказались пригодными для диагностики.

В случае с DOTATATE оказалось, что комплекс со скандием имеет меньшее сродство к рецепторам SSTR2, чем аналогичное соединение с галлием, что ограничивает интерес к его использованию [117]. DOTATATE также был помечен  $^{155}\text{Tb}$  ( $T_{1/2} = 5,32$  дня,  $E_{\gamma} = 87$  кэВ (32%), 105 кэВ (25%)) для получения изображений ОФЭКТ [118]. Хотя данный радионуклид является потенциально многообещающим для тераностических приложений, доступность  $^{155}\text{Tb}$  в настоящее время является основным ограничением для дальнейших исследований.

Интерес к другому изотопу, тербию-161, впервые возник еще в конце XX в:  $^{161}\text{Tb}$ -ДТРА-октреотид сравнивался с  $^{111}\text{In}$ -ДТРА-октреотид в исследовании на здоровых крысах и крысах с опухолями [119]. Ядерно-физические характеристики  $^{161}\text{Tb}$  идеальны как для терапии (период полураспада 6,91 дня, излучение бета-частиц с энергией 135, 154 и 180 кэВ), так и для интраоперационного КТ (наличие гамма-квантов низкой энергии 25, 48 и 74 кэВ). Оказалось, что поглощение  $^{161}\text{Tb}$ -ДТРА-октреотид SSTR-положительными органами (поджелудочная железа, надпочечники) ниже, чем в случае  $^{111}\text{In}$ -ДТРА-октреотид. Однако, поскольку выведение из крови первого соединения происходит быстрее чем второго, соотношение ткань/кровь выше у  $^{161}\text{Tb}$ -ДТРА-октреотид. В целом, на основании благоприятных физических характеристик  $^{161}\text{Tb}$  в сочетании с

исследованиями *in vitro* и *in vivo*, заключение по препарату [ $^{161}\text{Tb}$ ]-ДТРА-октреотид было положительным, и в дальнейшем  $^{161}\text{Tb}$  рассматривался как альтернатива  $^{177}\text{Lu}$  в экспериментах по мечению с DOTATATE [120].

Первое исследование с использованием  $^{161}\text{Tb}$  с другим аналогом - DOTATOC на людях было опубликовано лишь в 2021 году [121]. Данное исследование на двух пациентах продемонстрировало возможность визуализации даже небольших метастазов после инъекции относительно низкой активности [ $^{161}\text{Tb}$ ]-DOTATOC с использованием гамма-сцинтиграфии и ОФЭКТ. По-видимому, популярность  $^{161}\text{Tb}$  в ближайшем будущем будет только расти. В одном из самых недавних исследований авторы даже отошли от привычного DOTATATE и связали  $^{161}\text{Tb}$  с конъюгатом crown-ТАТЕ, в котором вместо ДОТА используется crown-лиганд (Рис.21). Получаемый комплекс образовывался в мягких условиях (комнатная температура, 10 мин) и накапливался у мышей в опухолях AR42J (рак поджелудочной железы крыс) [122].

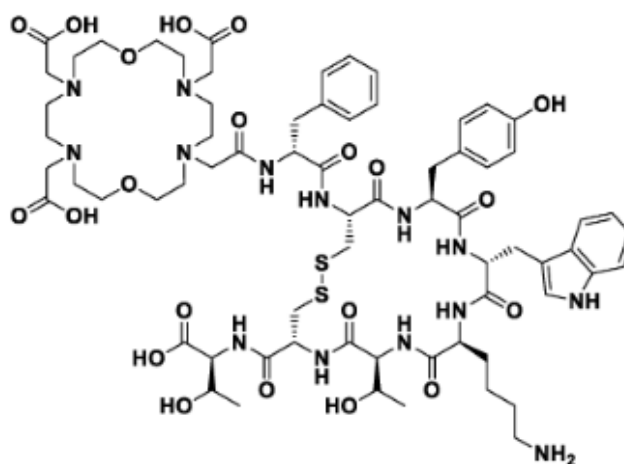


Рис.21. Конъюгат crown-ТАТЕ.

Перспективы дальнейшего применения изотопов тербия на прямую связана с возможностями их получения. Так,  $^{161}\text{Tb}$  обычно получают в реакторе, облучая мишень из  $^{160}\text{Gd}$  по схеме  $^{160}\text{Gd}(n,\gamma)^{161}\text{Gd}\rightarrow^{161}\text{Tb}$ . Впервые этот метод был предложен в работе [120], а позднее удалось получить до 20 ГБк  $^{161}\text{Tb}$  за одно облучение [123]. В базе МАГАТЭ [124] значится 36 работающих исследовательских реакторов, подходящих для наработки радионуклидов, однако большая их часть имеет возраст более 40 лет, и количество их сокращается. Это заставляет искать альтернативные пути получения реакторных радионуклидов. Для получения  $^{161}\text{Tb}$  на циклотроне можно использовать пучки дейтронов. Образование целевого изотопа идет по двум путям:  $^{160}\text{Gd}(d,n)^{161}\text{Tb}$  и

$^{160}\text{Gd}(d,p)^{161}\text{Gd} \rightarrow ^{161}\text{Tb}$ , однако получить  $^{161}\text{Tb}$  без существенной (10-20%) примеси долгоживущего изотопа  $^{160}\text{Tb}$  не удается [125].

В последние годы вырос интерес к фотоядерному методу получения радионуклидов, в том числе для медицинского применения. Было показано, что использование ускорителей электронов является хорошей альтернативой при производстве таких важных для медицины радионуклидов как  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  [126–128],  $^{67}\text{Cu}$  [129,130],  $^{47}\text{Sc}$  [131–133]. Также возможно получение в ограниченных масштабах  $^{177}\text{Lu}$  [134],  $^{167}\text{Tm}$  [135],  $^{195\text{m}}\text{Pt}$  [136,137].

Радионуклид  $^{149}\text{Tb}$  является единственным  $\alpha$ -излучающим лантанидом с периодом полураспада 4,12 часа, приемлемым для радионуклидной терапии, при этом 17% идет на  $\alpha$ -распад, 76% на захват электронов и 7% на испускание позитронов. Наличие позитронного излучения открывает перспективу визуализации распределения радиофармпрепарата с помощью позитронно-эмиссионной томографии. Таким образом,  $^{149}\text{Tb}$  может применяться в альфа-терапии; при лечении опухолей, оказавшихся резистентными к терапии бета-излучателями, а также в тераностике. По применению  $^{149}\text{Tb}$  с пептидными конъюгатами пока есть совсем не много работ: одно исследование, изучавшее противораковую эффективность препарата [ $^{149}\text{Tb}$ ]-DOTA-фолат (cm09) с использованием раковых клеток, экспрессирующих фолатные рецепторы, и мышей с аналогичными опухолями [138], а также отчет по получению  $^{149}\text{Tb}$  на предприятии ISOLDE и его применению с конъюгатами DOTATATE и DOTA-LM3 на мышах AR42J [139]. Несмотря на высокий интерес к данному радионуклиду, его доступность ограничена: практически единственным поставщиком  $^{149}\text{Tb}$  является предприятие ISOLDE в ЦЕРНе. В России показана возможность получения  $^{149}\text{Tb}$  в НИЦ «Курчатовский институт» путем облучения мишени из  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  частицами  $^3\text{He}$ , однако помимо тербия-149 в смеси продуктов присутствуют более долгоживущие изотопы, и возможность использования такой смеси хотя бы на клеточных линиях еще не изучена [140,141].

На рубеже 2000-х иттрий-86 ( $T_{1/2} = 14,74$  ч, 32%  $\beta^+$ ) считался потенциальным радионуклидом, представляющим интерес, особенно для предтерапевтической дозиметрии  $^{90}\text{Y}$ -радиоактивных индикаторов и, в частности,  $^{90}\text{Y}$ -меченных аналогов соматостатина [142]. В связи с этим несколько аналогов октреотида были помечены  $^{86}\text{Y}$  [143,144], при этом [ $^{86}\text{Y}$ ]-DOTATOC даже дошел до клинических испытаний [143,145],

однако ядерно-физические свойства  $^{86}\text{Y}$  не являются оптимальными, а производственная доступность ограничена, поэтому интерес к данному радионуклиду вскоре угас.

### ***1.13. Заключение из обзора литературы***

Нейроэндокринные опухоли относят к группе достаточно редких и трудно диагностируемых злокачественных патологий, и примерно в половине случаев верный диагноз ставится слишком поздно. На сегодняшний день в России отсутствуют зарегистрированные радиофармпрепараты для терапии нейроэндокринных опухолей, а производство таких препаратов непосредственно в клиниках только начинает зарождаться.

Научная литература содержит большое количество информации о разработанных аналогах гормона соматостатина, однако среди них ультракороткие линейные пептиды исследованы меньше всего. При этом изучение таких молекул и внедрение их в клиническую практику будет способствовать как удешевлению производства, так и расширению линейки доступных векторных молекул для пациентов. При изучении таких аналогов с точки зрения ядерной медицины логичным представляется их конъюгация с широко известным и тщательно изученным хелатором DOTA, используемым в клинической практике в составе различных РФП и способным связывать самые разнообразные катионы металлов.

Наиболее критичным параметром при исследовании новых аналогов SST является сродство к рецепторам, причем на данный фактор может влиять не только структура самого вектора, но также расположение хелатора и выбранный радионуклид. Фактически, как именно конъюгация с хелатором и образование комплекса с радионуклидом влияет на сродство к рецепторам, до конца не ясно. Предполагается, что наблюдаемые различия могут быть связаны со структурными изменениями в молекуле комплекса, влияющими на взаимодействие с рецептором. Конъюгация хелатора с векторной молекулой может влиять не только на саму биомолекулу и ее аффинность, но и на эффективность связывания какого-либо радионуклида. В свою очередь введение того или иного металла или замена его другим также может спровоцировать значительные изменения в аффинности к клеточным рецепторам и может оказать существенное влияние на биораспределение этих радиофармпрепаратов *in vivo*. Стоит отметить, что наблюдаемые различия в полученных значениях  $K_d$  или  $IC_{50}$  всегда связаны с конкретным экспериментом и не всегда напрямую свидетельствуют об эффективности или

неэффективности одного препарата перед другим, поэтому необходимо проводить комплекс исследований, включающий методы моделирования, анализы сродства «на прямую» на различных клеточных линиях и косвенные методы по наличию биологического эффекта, а также исследования аффинности в условиях *in vivo*.

Близкие химические и координационные свойства радионуклидов РЗЭ, а особенно лантаноидов, позволяют использовать наиболее удобные радионуклиды с точки зрения отработки методик синтеза и мечения пептидных конъюгатов, и предполагать аналогичные, или как минимум сходные, экспериментальные условия и результаты в случае радионуклидов, имеющих подходящие ядерно-физические свойства для целей ядерной медицины. Радионуклиды РЗЭ содержат весь спектр привлекательных медицинских как диагностических ПЭТ- и ОФЭКТ-радионуклидов ( $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{152}\text{Tb}$ ,  $^{155}\text{Tb}$ ), так и терапевтических  $\beta$ -излучателей ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ). Наиболее перспективная альфа-терапия в случае РЗЭ представлена лишь  $^{149}\text{Tb}$ , однако DOTA также образует высокоустойчивые комплексы с катионами висмута, имеющим  $\alpha$ -излучающие радионуклиды  $^{212,213}\text{Bi}$ .

В связи с вышеизложенным, короткие пептидные аналоги гормона соматостатина нециклического типа являются новыми мало исследованными объектами, и изучение комплексов с конъюгатами на их основе представляется важной фундаментальной и прикладной задачей для создания новых радиофармпрепаратов для опухолей, экспрессирующих рецепторы соматостатина.

## Глава 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Материалы и оборудование

В работе были использованы следующие реагенты: органические реагенты: этанол, пиридин (ХЧ), ацетонитрил, метанол (HPLC grade),  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (ОСЧ), ЭДТА, соли: перхлорат европия (III), нитрат иттрия, оксид скандия, нитрат тербия в качестве носителей для рабочих растворов радионуклидов; ацетат натрия, цитрат натрия, гидроксид натрия (ХЧ) использовались при приготовлении растворов элюентов для тонкослойной хроматографии.

Для приготовления рабочих растворов радионуклидов использовали  $\text{HCl}$  (конц.),  $\text{HNO}_3$  (конц.),  $\text{HClO}_4$  без предварительной очистки. Для приготовления буферных растворов использовали хлорид натрия, гидрофосфат натрия, хлорид калия, дигидрофосфат калия (ЧДА),  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (конц), ацетат аммония и 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES).

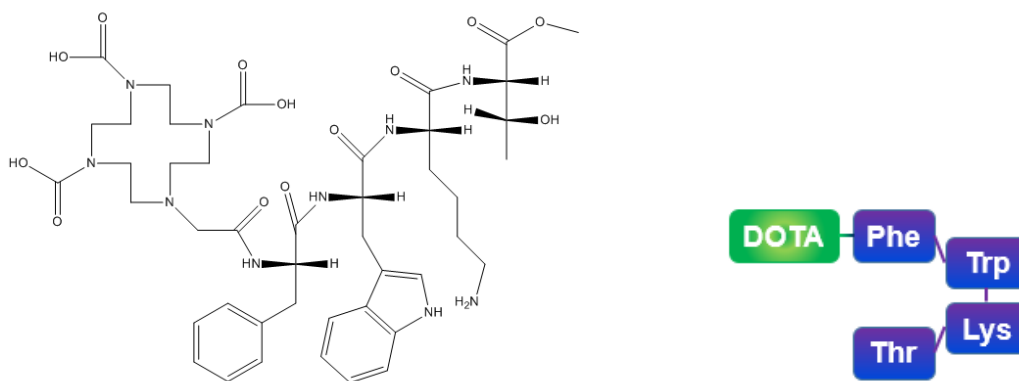
Все растворы готовили в деионизованной воде (18,2 МΩ).

Рабочие растворы  $^{152}\text{Eu}$  и  $^{207}\text{Bi}$  (Ritverc GmbH) приготовлены в 0,1 М  $\text{HCl}$ . Удельная активность составила 75 кБк/мл ( $^{152}\text{Eu}^{3+}$ ) и 150 кБк/мл ( $^{207}\text{Bi}^{3+}$ ).

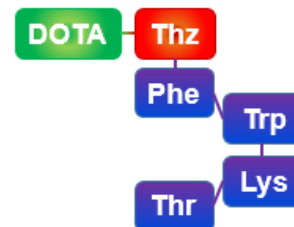
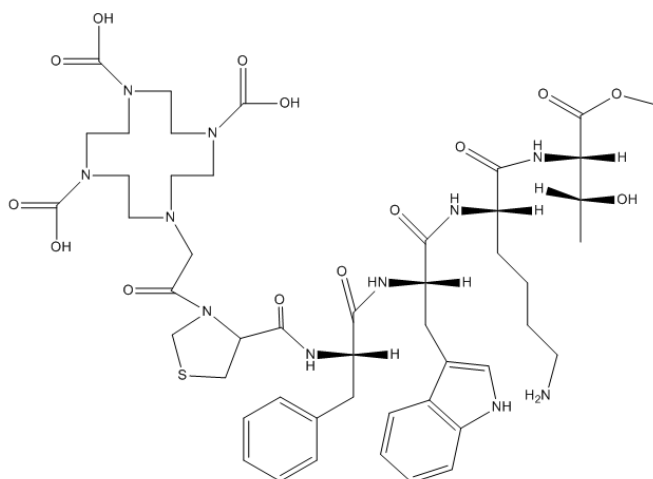
$^{90}\text{Y}$  выделяли из раствора  $^{90}\text{Sr}$  с помощью хроматографической смолы Sr-resin (Triskem inc.). Удельная активность составляла 170 кБк/мл.

Для анализа устойчивости использовалась эмбриональная телячья сыворотка HyClone.

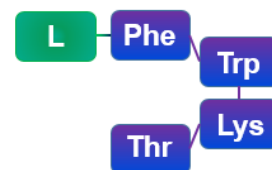
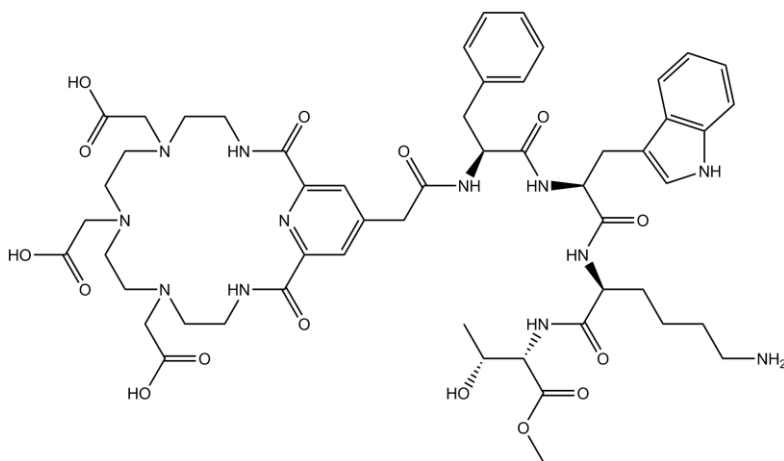
Конъюгаты DOTA-P (P = P1, P2, P3, P4) и L-P1 (Рис.22) были синтезированы в НИЦ «Курчатовский институт» - ИРЕА в лаборатории природных соединений под руководством Д.С. Хачатряна.



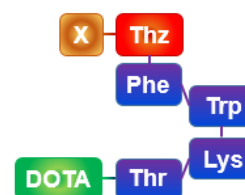
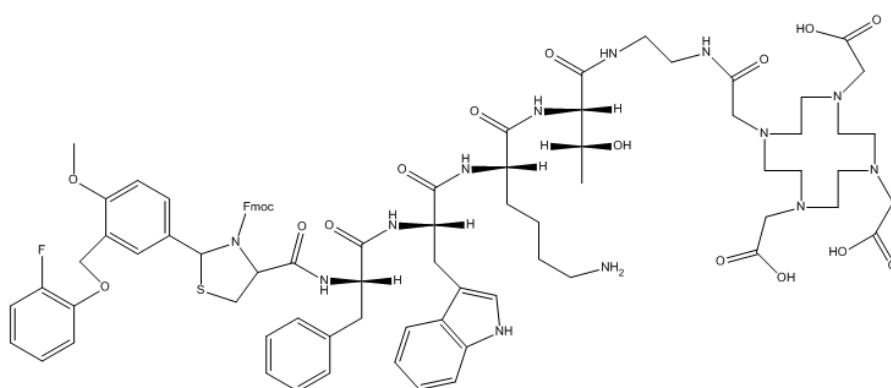
DOTA-Phe-D-Trp-Lys-Thr (DOTA-P1)



DOTA-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr (DOTA-P2)

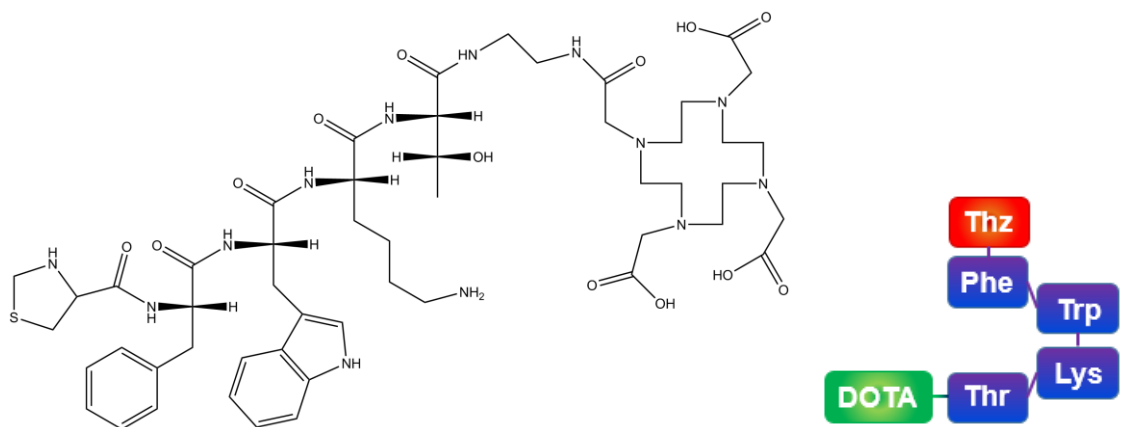


L-Phe-D-Trp-Lys-Thr (L-P1)



X-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA (DOTA-P3), X = Fpom





Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA (DOTA-P4)

Рис.22. Структурные формулы исследуемых в данной работе конъюгатов.

Измерение радиоактивности проводили с помощью гамма-спектрометра GC-3020 с полупроводниковым детектором из сверхчистого германия (Canberra Packard Ind., США) по линиям 120 кэВ ( $^{152}\text{Eu}$ ), 511 кэВ, 1157 кэВ ( $^{44}\text{Sc}$ ), 570 кэВ ( $^{207}\text{Bi}$ ).

Жидкостную сцинтилляционную спектроскопию (ЖСС) проводили с помощью спектрометра Perkin Elmer Tri-Carb 2810 TR.

Измерение оптического поглощения растворов проводили на спектрофотометре UV-1900i (Shimadzu, Япония).

Масс-спектрометрия проводилась с помощью масс-спектрометра Amazon Bruker с ионизацией методом электрораспыления в положительном режиме (3500 В). Сканирование масс в диапазоне  $m/z$  от 70 до 2200 Да.

Клеточная линия IMR-32 (человеческая нейробластома) была получена из Российской коллекции клеточных культур (Санкт-Петербург, Россия). Клетки содержались в культуральных колбах (Corning, США) в клеточной среде DMEM (Gibco, США) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки до 10% и гентамицина (50 мкг/мл, NuClone, США) в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $T = 37^\circ\text{C}$  в увлажненной атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$ . Клетки пассировались дважды в неделю с помощью раствора трипсин-ЭДТА.

Спектры кругового дихроизма были получены с помощью спектрометра Chirascan Q100 (Applied Photophysics, UK).

Навески реагентов взвешивали на электронных весах GR-200 A&D (Япония).

Измерение pH проводили на pH-метре фирмы «Эконикс-эксперт».

В работе использовали центрифугу Eppendorf centrifuge 5418.

## **2.2. Генератор $^{44}\text{Ti}$ - $^{44}\text{Sc}$**

Для создания генераторной системы  $^{44}\text{Ti}$ - $^{44}\text{Sc}$  использовался  $^{44}\text{Ti}$ , адсорбированный на колонке, заполненной анионообменной смолой TEVA (Triskem inc.). Для выделения  $^{44}\text{Sc}$  через колонку пропускались 5 мл раствора смеси 0,005М  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ /0,065 М  $\text{HCl}$ . Для очистки раствора  $^{44}\text{Sc}$  от конкурирующих оксалат-анионов раствор радионуклида пропускали через дополнительную колонку очистки, заполненную катионообменной смолой DOWEX 50W-X8. Колонку с адсорбированным  $^{44}\text{Sc}$  промывали 3 мл воды до нейтрального значения pH. Затем  $^{44}\text{Sc}$  смывали раствором 4 мл 0,5 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 4,0) фракциями по 0,5 мл. Максимальная удельная активность  $^{44}\text{Sc}$  составляла 5 кБк/мл.

## **2.3. Синтез комплексов M-DOTA-P и Bi-L-P1**

Для синтеза комплексов [M]M-DOTA-P (P = P1, P2, P3, P4, M =  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{207}\text{Bi}$ ) смешивали различные объемы 0,002 М раствора DOTA-P, 10 мкл рабочего раствора радионуклида и 20 мкл 10 мкМ растворов носителей ( $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ ;  $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ ) и доводили общий объем до 400 мкл. Необходимое значение pH растворов устанавливали добавлением 0,2 М раствора карбоната натрия.

Для синтеза комплексов [ $^{44}\text{Sc}$ ]Sc-DOTA-P различные объемы 0,002 М раствора DOTA-P и 4 мкМ раствора  $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3$  добавляли к 500 мкл раствора  $^{44}\text{Sc}$  в 0,5 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 4,0). Необходимое значение pH растворов устанавливали добавлением  $\text{HCl}$  (конец) или  $\text{NaOH}$  (конец).

Полученный раствор выдерживали в сушильном шкафу при выбранной температуре в течение выбранных промежутков времени.

При необходимости для немедленной остановки реакции мечения к 50 мкл раствора добавляли 10 мкл 8 мМ раствора ДТРА.

Синтезы повторяли при различных концентрациях DOTA-P:  $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , значениях pH в интервале 2,3 – 8,4, температурах: 37, 60, 75, 90°C.

Синтез комплексов [ $^{207}\text{Bi}$ ]Bi-L-P1 проводили аналогично комплексам [ $^{207}\text{Bi}$ ]Bi-DOTA-P.

## **2.4. Тонкослойная хроматография**

Для определения радиохимической чистоты препарата (выхода реакции мечения) проводили анализ полученных комплексов методом тонкослойной хроматографии. В

качестве неподвижной фазы использовались сорбенты целлюлоза на алюминии (Fluka, Германия), силикагель на алюминии (Sigma-Aldrich, Германия) и пластины iTLC-SG (Agilent Technologies, США).

Для подбора условий для проведения ТСХ были приготовлены следующие элюенты:

- 1)  $\text{CH}_3\text{OH} : 10\% \text{CH}_3\text{COONa} = 1:1$  (V:V)
- 2)  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N} : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 1:2:4$
- 3) 0,1M  $\text{H}_3\text{Cit}/\text{Na}_3\text{Cit}$ , pH 5
- 4) 0,9% NaCl в 0,01M NaOH
- 5)  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{NH}_3 = 1:1:2$
- 6) 0,01M ЭДТА, pH 6

ТСХ пластины готовили в виде полосок длиной 10 см и шириной 1,5 см, линию старта проводили на расстоянии 1,5 см от края. Полоски предварительно насыщали раствором элюента, подсушивали, затем наносили исследуемый раствор в количестве 10-50 мкл на линию старта. Помещали полоски с исследуемым раствором в стакан с элюентом и ждали, пока элюент поднимется до уровня 0-0,5 см от края пластины.

Экспонирование полученных хроматограмм и установление распределения активности на хроматографической полоске проводили с помощью цифровой автордиографии (Cyclone Storage Phosphor System).

Для проведения количественного анализа полученные хроматограммы разрезали на участки одинаковой геометрии и проводили измерения с помощью гамма-спектрометрии.

### ***2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография***

Определение радиохимической частоты полученных комплексов методом ВЭЖХ проводили с помощью ВЭЖХ-установки (Binary HPLC Pump, UV detector, refractive index detector, Waters) при длинах волн 210 и 280 нм, колонка C18, 12,5x0,4 см.

Готовили элюенты: ацетонитрил, 0,1% и 0,01% трифторуксусная кислота в ацетонитриле, 0,1% и 0,01% трифторуксусная кислота в воде. Элюенты пропускали через систему дегазации, затем выдерживали в ультразвуковой ванне.

Режим элюирования подбирали с помощью эталонных  $1 \cdot 10^{-4}$ М растворов DOTA-P и L-P1 (представлены в таблицах 4-6).

Таблица 4. Режим элюирования для ВЭЖХ-анализа [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOТА-P1.

Время, мин	А(%): H <sub>2</sub> O, 0,1% TFA	В(%): CH <sub>3</sub> CN, 0,1% TFA
0	90	10
6	30	70
8	30	70
10	10	90
17	90	10

Таблица 5. Режим элюирования для ВЭЖХ-анализа [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOТА-P2.

Время, мин	А(%): H <sub>2</sub> O, 0,1% TFA	В(%): 80% CH <sub>3</sub> CN + 20% А
0	80	20
30	20	80
40	20	80
60	80	20

Таблица 6. Режим элюирования для ВЭЖХ-анализа [<sup>207</sup>Bi]Bi-L-P1 и [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOТА-P4.

Время, мин	А(%): H <sub>2</sub> O, 0,1% TFA	В(%): CH <sub>3</sub> CN, 0,1% TFA
0	95	5
20	0	100
25	95	5

20 мкл анализируемого раствора вводили в инжектор и собирали фракции с интервалом в 1 минуту.

Проводили измерения собранных фракций с помощью жидкостной сцинтилляционной спектрометрии и гамма-спектрометрии.

### ***2.6. Стабильность в физиологическом растворе***

Для анализа стабильности использовались образцы комплексов [M]M-DOТА-P с радиохимической чистотой 95-98%.

Готовили 0,9% раствор хлорида натрия. Смешивали раствор, содержащий комплекс [M]M-DOТА-P с физиологическим раствором в соотношении 1:4 и помещали смесь в сушильный шкаф при температуре 37°C. Через некоторые промежутки времени часть раствора отбирали и анализировали с помощью тонкослойной хроматографии, автордиографии и гамма-спектрометрии.

## 2.7. Стабильность в сыворотке

Растворы комплексов [M]M-DOTA-P, [<sup>207</sup>Bi]Bi-L-P1 смешивали с эмбриональной телячьей сывороткой в соотношении 1:100 общим объемом 1,5 мл, перемешивали и выдерживали в термостате при 37°C. Через некоторые интервалы времени отбирали 100 мкл, добавляли 300 мкл этанола, перемешивали, раствор охлаждали, центрифугировали 5 минут при 4200g, отделяли и анализировали маточный раствор с помощью гамма-спектрометрии. Параллельно проводили «холостой» эксперимент с использованием раствора свободного катиона с тем же значением pH. Условия эксперимента предварительно оптимизировали, полноту разделения осадка и маточного раствора контролировали с помощью метода динамического светорассеяния.

Полноту осаждения белков проверяли с помощью метода Бредфорда. Для этого готовили образцы эмбриональной бычьей сыворотки, разбавленные в 10, 100, 1000 и 10000 раз. К 300 мкл каждого такого раствора добавляли 2 мл реагента Бредфорда (Таблица 7), инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин и измеряли оптическое поглощение при  $\lambda=595$  нм. Аналогичную процедуру повторяли для образцов маточных растворов, полученных в эксперименте по стабильности после центрифугирования, разбавленных в 10 раз, поскольку этанол вносит погрешность в результаты измерения при его содержании в образце > 10%. Также маточные растворы анализировались на наличие белка с помощью биуретовой реакции: к маточному раствору добавляли по 4-5 капель растворов 10% NaOH и 1% CuSO<sub>4</sub>.

Таблица 7. Состав реагента Бредфорда.

Кумасси синий G-250	5 мг
Этанол	2,5 мл
Ортофосфорная кислота	5 мл
H <sub>2</sub> O mQ	до 50 мл

## 2.8. Стабильность в присутствии биологически значимых катионов

20 мкл раствора комплекса [M]M-DOTA-P смешивали с 400 мкл раствора, содержащего один из катионов: Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> (0,1 мМ), Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> (5 мМ). Смесь помещали в сушильный шкаф при температуре 37°C. Через некоторые промежутки

времени часть раствора отбирали и анализировали с помощью тонкослойной хроматографии, автордиографии и гамма-спектрометрии.

### 2.9. Масс-спектрометрия

20 мкл 2 мМ раствора DOTA-P (P = P1, P2) смешивали с 40 мкл 1 мМ раствора  $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$  и 330 мкл воды. Значение pH растворов 8,2-8,4 достигалось добавлением 0,2 М раствора карбоната натрия. Полученный раствор Eu-DOTA-P1 выдерживался в течение 30 мин при  $T = 90^\circ\text{C}$  (образец *a*). Полученный раствор Eu-DOTA-P2 был разделен на 6 частей. 4 образца выдерживались при  $T = 90^\circ\text{C}$  в течение разных промежутков времени: 15 мин (образец *b*), 30 мин (образец *c*), 1 ч (образец *d*), 1,3 ч (образец *e*). Один образец выдерживался при  $T = 37^\circ\text{C}$  в течение 4 дней (образец *f*), и один образец выдерживался при комнатной температуре в течение 7 дней (образец *g*).

### 2.10. Анализ сродства меченных комплексов к рецепторам соматостатина

Для проведения клеточных экспериментов готовили буфер PBS (таблица 8).

Таблица 8. Состав буфера PBS.

Компонент	Концентрация, мг/л
KCl	200
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	200
NaCl	8000
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2160
$\text{NaN}_3$	5025

Клетки IMR-32 отмывали от культуральной среды путем центрифугирования при 400 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл PBS, добавляли 10 мл PBS, снова центрифугировали, процедуру повторяли 3 раза. Ресуспендировали клетки в 1 мл PBS, добавляли необходимый объем PBS для получения концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл.

По 0,5 мл суспензии клеток добавляли в микропробирки максимально равномерно и помещали в термостат при  $T = 4^\circ\text{C}$ . Готовили и добавляли к клеткам по 0,5 мл раствора меченого пептида ( $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P}$ , P = P1, P3, P4) в выбранных концентрациях и смеси пептида с немеченым октреотидом в 100- или 1000-кратном избытке по отношению к

меченному пептиду. Растворы перемешивали и выдерживали 2 ч при  $T = 4^{\circ}\text{C}$ . В течение всего времени выдерживания растворы перемешивались каждые 15 мин.

По окончании 2 ч растворы центрифугировали (400g, 5 мин,  $4^{\circ}\text{C}$ ), супернатант отбирали, осадок ресуспендировали в 1 мл холодного PBS (3 раза) и снова центрифугировали. Процедуру повторяли 3 раза. Осадок ресуспендировали в PBS и переносили во флакон для измерений. С помощью ЖСС измеряли активность клеточной фракции и супернатанта. Специфичное связывание рассчитывали, как разность между общим связыванием (в отсутствие октреотида) и неспецифичным связыванием (в присутствии октреотида).

### **2.11. Спектроскопия кругового дихроизма**

250 мкл раствора DOTA-P и Sc-DOTA-P ( $P = P1, P2, P3, P4$ ) в 0,01 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 4) добавляли в кювету с длиной 0,1 см. Каждое сканирование выполнялось в диапазоне 190-320 нм и регистрировалось с шагом 1 нм. Полученные спектры представляли собой среднее значение из трех сканирований, скорректированных путем вычитания спектра фонового раствора (буферного агента).

### **2.12. Проведение экспериментов *in vivo***

Распределение препарата изучалось на организме самцов иммунодефицитных лабораторных мышей Nu/j. Мыши содержались в условиях 12-часового суточного цикла с доступом к корму и воде *ad libitum*. Для каждой экспериментальной точки было использовано по 4 мыши.

По истечении двухнедельного карантина мышам производилась подкожная инъекция 200 мкл суспензии клеток IMR-32 в PBS в количестве 6-10 млн клеток на мыш. Рост опухолей наблюдали в течение 5 недель. Контроль за размером опухолей осуществляли путем измерения их длины и ширины с помощью штангенциркуля, объем опухоли рассчитывали по формуле:

$$V = w^2 \cdot \frac{l}{2}$$

где  $w$  и  $l$  – ширина и длина опухоли в мм соответственно.

При достижении объема опухоли в 100 мкл мыши разделялись на 4 группы в зависимости от вводимого вещества (таблица 9). Степень мечения вводимого вещества составляла не менее 95% (по результатам ТСХ). Все исследуемые вещества вводились

внутривенно (в хвостовую вену). Растворы  $[^{152}\text{Eu}]\text{EuCl}_3$ ,  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTATATE}$  и  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$  с концентрацией лиганда  $1 \cdot 10^{-4}$  М разводили в стерильном изотоническом растворе. Мышам внутривенно вводили 3 кБк в 100-150 мкл раствора. Для «блокирующих» экспериментов предварительно вводили 10-кратный избыток октреотида.

Таблица 9. Разделение животных на группы в зависимости от вводимого вещества.

№ группы	Вводимое вещество
1	$[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$
2	$[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTATATE}$
3	$[^{152}\text{Eu}]\text{EuCl}_3$
4	$[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$ + октреотид (10-кратный избыток)

В течение выбранного временного промежутка мыши содержались в метаболической камере с возможностью сбора отходов жизнедеятельности (моча и фекалии). Мышь усыплялась, затем подвергалась эвтаназии с помощью цервикальной дислокации и декапитации через 6 часов после введения. Органы (сердце, легкие, печень, почки, селезенка, поджелудочная железа, мозг, бедренная кость) отделялись постмортально, промывались в физиологическом растворе и взвешивались, накопленная в органах радиоактивность измерялась с помощью гамма-спектрометрии. Кровь собиралась после декапитации и смешивалась со 100 мкл раствора гепарина. Моча собиралась после вскрытия из мочевого пузыря с помощью шприца. Образцы мочи без дополнительной очистки анализировались с помощью ВЭЖХ и ТСХ в условиях, аналогичных условиям для анализа соответствующих комплексов.

Процент от введенной дозы на грамм органа рассчитывался по формуле:

$$\% \frac{ID}{g} = \frac{A}{A_{\text{сум}} \cdot m_{\text{орг}}} \cdot k \cdot 100$$

где  $A$  – измеренная активность, накопленная в органе,  $A_{\text{сум}}$  – суммарная активность введенного препарата,  $m_{\text{орг}}$  – масса органа,  $k$  – коэффициент пересчета, учитывающий объем измеряемого образца. Операционные процедуры проводились в соответствии с руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [146] и директивой Европейской комиссии 2010/63/EU и были одобрены Комиссией МГУ по биоэтике (заявка 128-а, редакция №2, протокол заседания 131-д от 31.05.2021).



### 2.13. Фотоядерное получение и выделение $^{161}\text{Tb}$

$^{\text{Nat}}\text{Dy}_2\text{O}_3$  был получен отжигом  $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma). Чистота  $^{\text{Nat}}\text{Dy}_2\text{O}_3$  составила 97.22% по результатам ICP-MS (основная примесь Ce - 2.78%). Мишени из оксида диспрозия природного изотопного состава ( $\chi(^{156}\text{Dy}) = 0,056\%$ ,  $\chi(^{158}\text{Dy}) = 0,095\%$ ,  $\chi(^{160}\text{Dy}) = 2,329\%$ ,  $\chi(^{161}\text{Dy}) = 18,889\%$ ,  $\chi(^{162}\text{Dy}) = 25,475\%$ ,  $\chi(^{163}\text{Dy}) = 24,896\%$ ,  $\chi(^{164}\text{Dy}) = 28,26\%$ ) готовили по методике [147]. К навескам порошка  $\text{Dy}_2\text{O}_3$  массой 170-180 мг, добавляли 6-7 мл ацетона и коллодий (3,2 % по массе динитроцеллюлозы) и 800-1000 мкл суспензии высушивали на алюминиевой подложке толщиной 22 мкм. Толщину каждой мишени определяли взвешиванием. Она составляла 37,3 мг/см<sup>2</sup> в пересчете на  $\text{Dy}_2\text{O}_3$ , диаметр пятна 10 мм. Покрытие визуально выглядело однородным, не имело дефектов, и прочно держалось на подложке. Поверхность мишени дополнительно покрывали 8,3 мкм алюминиевой фольгой.

Мишень была облучена на тормозном пучке разрезного микротрона НИИЯФ МГУ им. Д.В. Скобельцина гамма-квантами с максимальной энергией 55 МэВ в течение ~7 часов (24746 с). Толщина конвертора 2,1 мм, материал – вольфрам. Для определения среднего тока пучка одновременно облучали фольгу из металлического кобальта (99 мг/см<sup>2</sup>). Нормировка тока проводилась по реакциям  $^{59}\text{Co}(\gamma, n)^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Co}(\gamma, n)^{58\text{m}}\text{Co}$  и  $^{59}\text{Co}(\gamma, 2n)^{57}\text{Co}$ . Средний ток пучка составил 183 нА.

Регистрация гамма-излучения проводилась с помощью гамма-спектрометра с полупроводниковым детектором GR3818 (Canberra Ind., США), оснащенный входным окном из гофрированного алюминия. Относительная эффективность детектора 38%, разрешение 1,9 кэВ для линии 1332 кэВ. Детектор расположен внутри пассивной защиты из свинца толщиной 10 см. Обработку спектра проводили с помощью программного пакета SpectraLine, разработка компании LSRM, Россия. Калибровку детектора по эффективности проводили с помощью стандартных гамма-спектрометрических источников  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{241}\text{Am}$ . Расстояние от источника до корпуса детектора при измерениях составляло 1 см.

Выходы радионуклидов рассчитывали исходя из активностей, пересчитанных на конец облучения (ЕОВ) по формуле:

$$Y = \frac{A\lambda}{ix(1 - e^{-\lambda t})}$$

Где  $Y$  – выход ( $\text{кБк} \cdot \text{мкА}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{ГDy}_2\text{O}_3^{-1}$ ),  $A$  – активность ( $\text{кБк}$ ),  $\lambda$  – постоянная распада ( $\text{ч}^{-1}$ ),  $i$  – ток электронного пучка ( $\text{мкА}$ ),  $x$  – толщина мишени ( $\text{г} \cdot \text{см}^{-2}$ ),  $t$  – время облучения ( $\text{ч}$ ).

В облученной мишени были идентифицированы радионуклиды диспрозия  $^{155}\text{Dy}$  и  $^{157}\text{Dy}$ , и тербия  $^{155}\text{Tb}$ ,  $^{160}\text{Tb}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{163}\text{Tb}$  (Таблица П1). На рис. 23 представлен гамма-спектр облученной мишени.

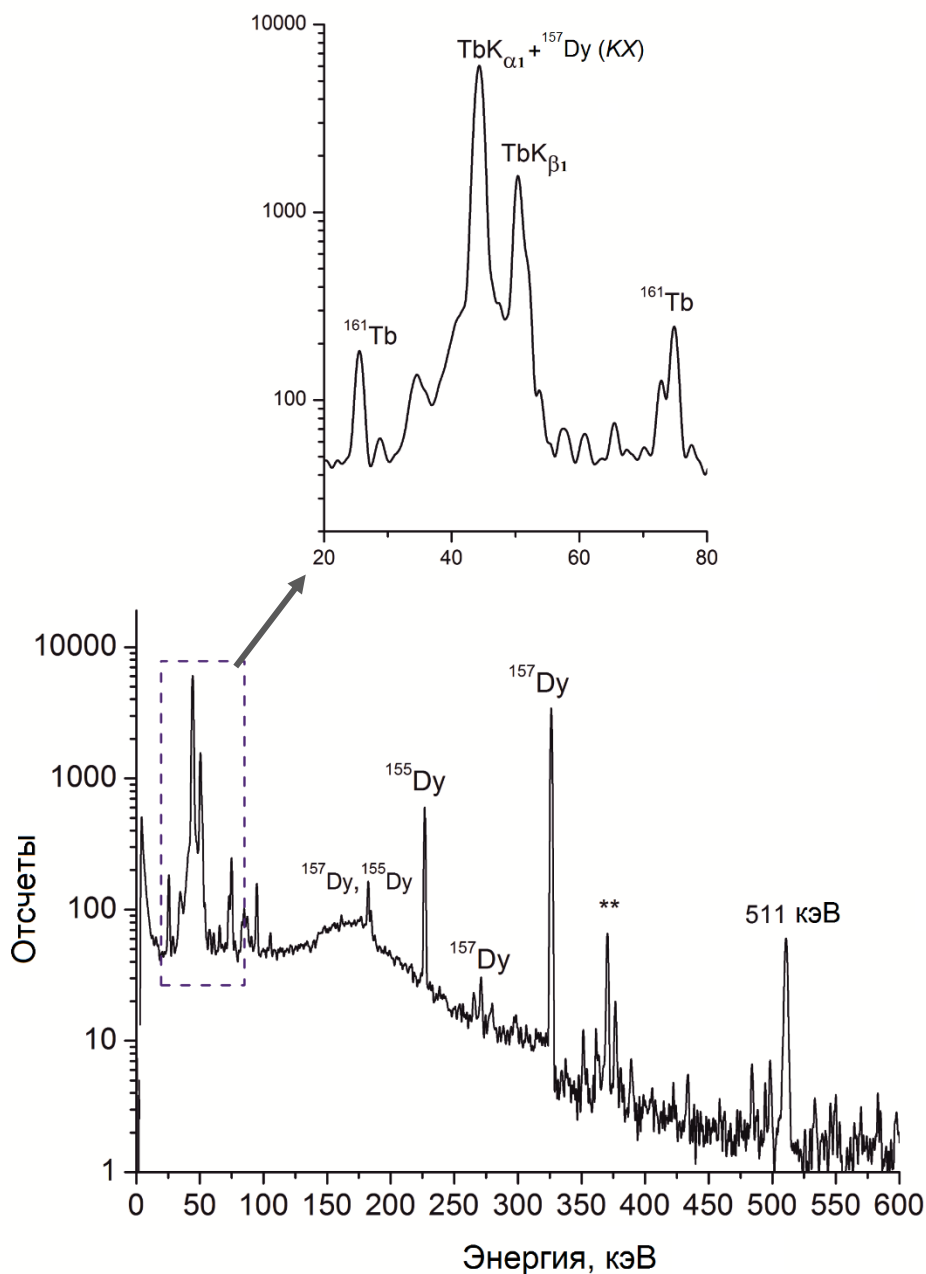


Рис. 23. Гамма-спектр облученной мишени. \*\* - 370 и 376 кэВ - пики суммирования гамма и рентгеновских квантов: 326 кэВ ( $^{157}\text{Dy}$ ), 44 кэВ и 50 кэВ (X-ray).

Для выделения целевого  $^{161}\text{Tb}$ , материал мишени отделяли от алюминиевой подложки, и растворяли в 5,6 М  $\text{HNO}_3$ . Раствор упаривали практически досуха и доводили до 2 мл 0,5 М  $\text{HNO}_3$ . Колонка высотой 25 см и внутренним диаметром 4 мм была

заполнена сорбентом LN Resin (размер зерен 100–150 мкм, производство TrisKem International), предварительно уравновешенным в 0,5 М HNO<sub>3</sub>. Для каждого эксперимента брали 1 г сухой смолы. Всего было проведено два эксперимента с аликвотами растворенной мишени, содержащими разные массы стабильного диспрозия (№ 1 – 2 мг и № 2 – 20 мг), для установления оптимального диапазона емкости сорбента. Сначала элюировали 0,5 М HNO<sub>3</sub>, затем кислотность меняли на 3 М HNO<sub>3</sub>. Фракции собирали по 5 мл и контролировали содержание радионуклидов методом гамма-спектрометрии по линиям 25,65 кэВ (<sup>161</sup>Tb) и 326,16 кэВ (<sup>157</sup>Dy). Хроматограммы выделения представлены на рис. 24. Фракции № 5–9 (25 мл) из эксперимента № 2, содержащие 43% <sup>161</sup>Tb от общего количества тербия и около 8% диспрозия, объединяли, упаривали почти досуха и доводили до 1 мл 0,5 М HNO<sub>3</sub>. Затем процедуру разделения повторяли (эксперимент № 3), профиль элюирования выглядел аналогично Рис. 24а. Объединенную фракцию <sup>161</sup>Tb из эксперимента 3 упаривали до 5 мл и измеряли гамма-спектр с длительной экспозицией (рис.25). По результатам разделения выход <sup>161</sup>Tb составил 39%. В спектре были идентифицированы пики <sup>161</sup>Tb, <sup>160</sup>Tb и <sup>155</sup>Tb, содержание примеси долгоживущего <sup>160</sup>Tb составило 7,3%. Исходная активность <sup>161</sup>Tb в мишени составила 380 Бк.

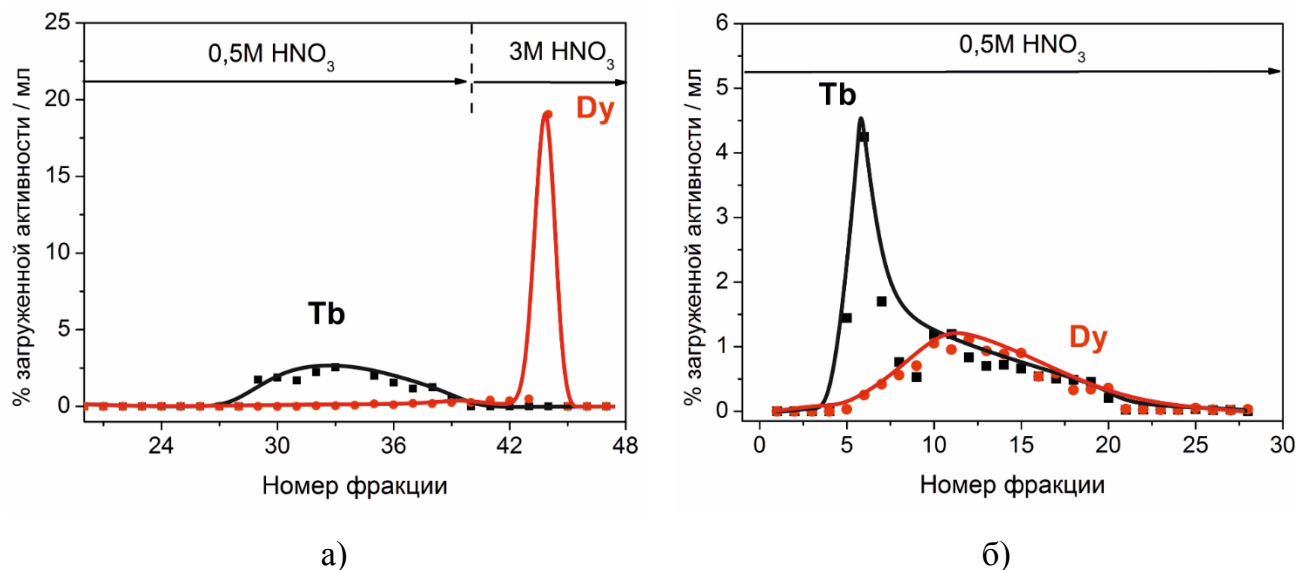


Рис. 24. Хроматограммы выделения <sup>161</sup>Tb при загрузке 2 мг (а) и 20 мг (б) мишенного материала (при пересчете на металлический Dy).

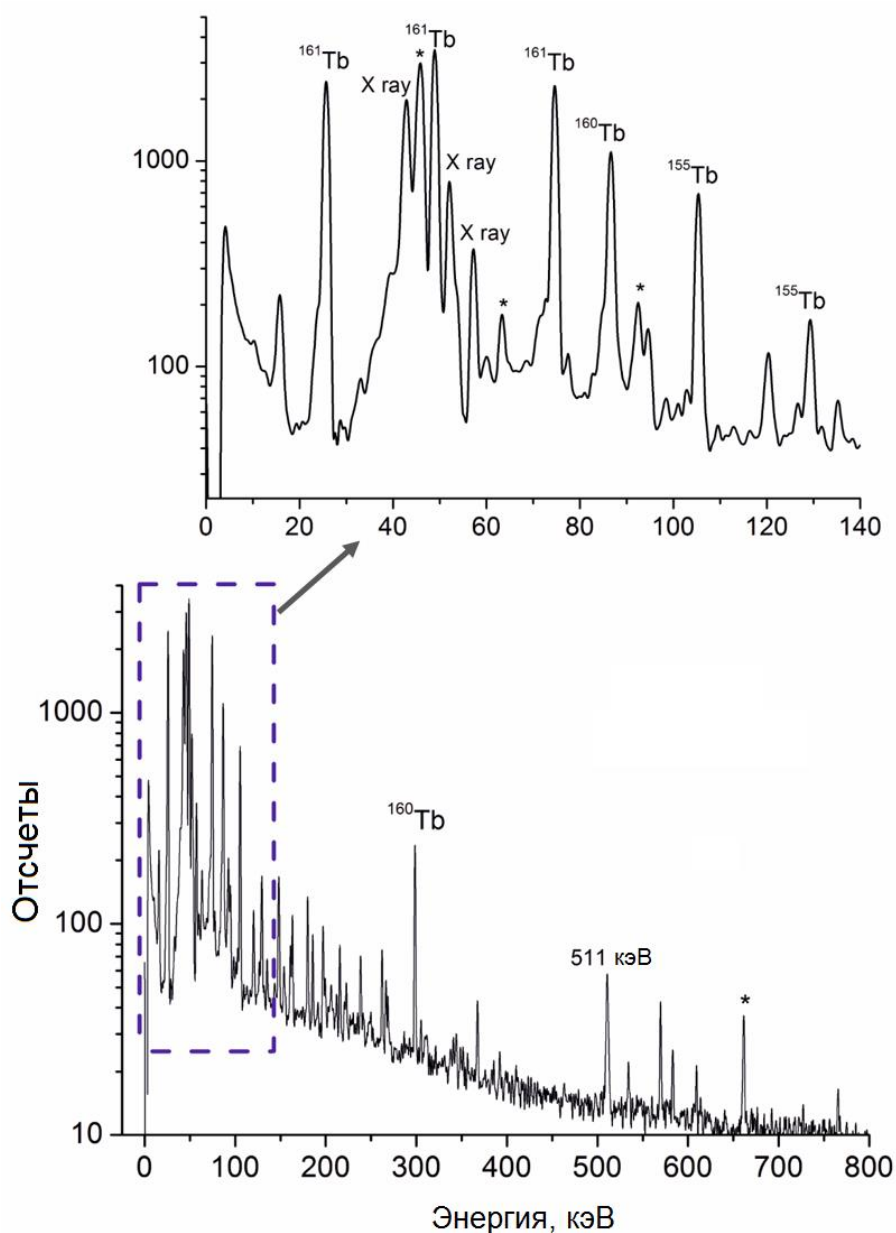


Рис. 25. Гамма-спектр раствора  $^{161}\text{Tb}$ . \* - пики, относящиеся к природному фону.

#### 2.14. Расчетная часть

Моделирование третичной структуры соматостатиновых рецепторов (SSTR1-SSTR5) осуществлялось с помощью сервиса Phyre2 [148] по имеющимся аминокислотным последовательностям (база данных белковых структур UniProt [149]).

Уточнение полученных структур, оптимизация геометрии и минимизация энергии проводилось с помощью методов молекулярной динамики: программный пакет GROMACS [150], силовое поле GROMOS (gromos43a2) [151]. Траектории рассчитывались с длительностью по времени 10-20 нс с помощью гри-вычислительных кластеров суперкомпьютера Ломоносов [152].

Для моделирования липидного бислоя были использованы файлы и параметры силового поля для липидов [153].

Молекулярный докинг макромолекулы рецептора и молекулы-лиганда проводился с помощью программы Autodock4 [154].

Расчет площади поверхности, доступной для растворителя (Solvent accessible surface area, SASA) для хелатора DOTA в составе конъюгатов DOTA-P1, DOTA-P2, DOTA-P4 производился так же с помощью методов молекулярной динамики: программный пакет GROMACS, силовое поле GROMOS (gromos43a2). Топологические параметры молекул DOTA и Thz были получены с помощью онлайн-сервиса PRODRG [155]. Траектории рассчитывались с длительностью по времени 8 нс и анализировались с помощью встроенной функции «SASA» для расчета площади поверхности молекулы, доступной для растворителя.

## Глава 3. Определение оптимальных условий образования меченных комплексов

Контроль качества радиофармпрепаратов - один из важных этапов при производстве РФП, осуществляемый в соответствии с принципами надлежащей производственной практики (GMP), а также нормативными документами. Стандартными методами определения радиохимической чистоты радиофармпрепаратов в рамках контроля качества являются тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматография.

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

1. Yakusheva A.O., Titchenko N.A., Egorova B.V., Matazova E.V., Podkhalyuzina N.Ya., Osipov V.N., Khachatryan D.S., Avdeev D.V., 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.
2. Fedotova 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.

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 10 и распределение форм катионов от pH раствора представлены на рис. П1. Медицинские радионуклиды  $^{44}\text{Sc}$  и  $^{90}\text{Y}$  были рассмотрены в обзоре литературы. 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.

### *3.1. Подбор условий для анализа методом тонкослойной хроматографии*

Синтезированный комплекс [M]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 (ТСХ). При подборе условий для проведения анализа ТСХ использовали различные комбинации подвижной и неподвижной фазы.

Таблица 10. Радиусы исследуемых катионов [156] и константы гидролиза по первой ступени [157].

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

Полученные хроматограммы экспонировали с помощью автордиографии. Подходящая система для ТСХ должна включать в себя такие подвижную и неподвижную фазы, при которых на получаемой хроматографической пластинке после проведения автордиографии наблюдаются четкие пятна свободного катиона  $M^{3+}$  и металла, связанного в комплекс M-DOTA-P (Рис.26). По результатам подбора условий были подобраны системы для анализа всех исследуемых комплексов (Таблица 11). В большинстве случаев наиболее подходящими оказались системы, в которых в качестве подвижной фазы выступает элюент, проявляющий хелатирующие свойства:  $H_3Cit/Na_3Cit$  и  $Na_2H_2EDTA$ , в таких системах меченый комплекс остается на старте, а свободный катион хелатируется подвижной фазой и движется с фронтом.

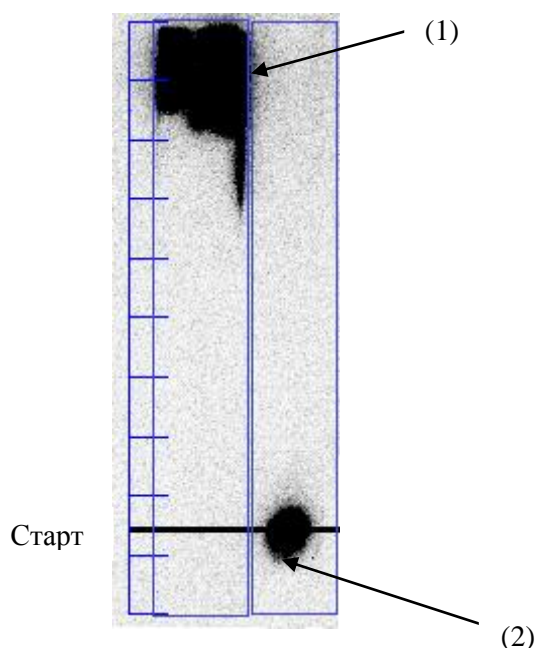


Рис.26. Разделение пятен свободного  $Eu^{3+}$  (1) и европия, связанного в комплекс Eu-DOTA-P4 (2).

Таблица 11. Подобранные системы «подвижная фаза – сорбент» для анализа исследуемых комплексов методом ТСХ.

Комплекс	Система ТСХ	$R_f (M^{free})$	$R_f (M-DTPA)$	$R_f (M^{comp})$
[M]M-DOTA-P1 (M=Sc,Bi)	0,01M ЭДТА, pH 6, целлюлоза (Al)	1	1	0,8
[ <sup>44</sup> Sc]Sc-DOTA-P2		1	1	0,3
[M]M-DOTA-P4 (M=Sc,Bi)		1	1	0
[ <sup>207</sup> Bi]Bi-DOTA-P2		1	1	0,7
[M]M-DOTA-P3		1	1	0
[ <sup>161</sup> Tb]Tb-DOTA-P4		1	1	0
[ <sup>152</sup> Eu]Eu-DOTA-P1	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N : C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH : H <sub>2</sub> O = 1:2:4 (V), силикагель (Al)	0	0,8	0,5
[ <sup>152</sup> Eu]Eu-DOTA-P2		0	0,8	0,6
[ <sup>152</sup> Eu]Eu-DOTATATE		0	0,8	0,3
[M]M-DOTA-P4 (M=Y, Eu)	0,1M H <sub>3</sub> Cit/Na <sub>3</sub> Cit, pH 5, силикагель (Al) /iTLC-SG	1	1	0
[ <sup>90</sup> Y]Y-DOTA-P (P=P1,P2)	0,9% NaCl : ACN = 6:1 (V), силикагель (Al)	0	0,6	0,3
[ <sup>207</sup> Bi]Bi-L-P1	0,9% NaCl в 0,01M NaOH, целлюлоза (Al)	0	1	0,8

### 3.2. Мечение DOTA-P1

Терапевтические радиофармпрепараты с <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y и <sup>213</sup>Bi содержат радиоактивность в диапазоне от 1 до 10 ГБк, что соответствует концентрации катионов от 0,5 до 10 мкМ (Y<sup>3+</sup> и Lu<sup>3+</sup>) и от 0,01 до 0,1 мкМ (Bi<sup>3+</sup>) [109,158,159]. РФП с радионуклидами РЗЭ (<sup>149</sup>Tb и <sup>44</sup>Sc) содержат от 0,5 до 10 нМ соответствующих катионов [115,138]. Для моделирования терапевтического количества <sup>213</sup>Bi, для мечения конъюгатов использовали растворы с активностью <sup>207</sup>Bi 6 кБк, что соответствует с(Bi<sup>3+</sup>) = 0,04 мкМ. Из-за схожего химического поведения всех лантаноидов, оптимальные



условия мечения для европия были определены с добавлением следовых количеств  $^{152}\text{Eu}$  (3 кБк) и носителя  $\text{Eu}^{3+}$  для поддержания  $c(\text{Eu}^{3+}) = 0,2$  мкМ в соответствии с терапевтическими концентрациями  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$ . Мечение с катионами  $^{44}\text{Sc}^{3+}$  и  $^{90}\text{Y}^{3+}$  проводили аналогично с добавлением носителя.

Хорошо известно, что пептидные радиофармацевтические препараты, конъюгированные с  $\text{H}_4\text{DOTA}$  в качестве хелатирующего агента, образуют комплексы с катионами металлов только при повышенных температурах до  $100^\circ\text{C}$ . Несмотря на высокие константы комплексообразования  $\text{DOTA}$  со многими катионами, кинетика хелатирования в нормальных условиях окружающей среды очень медленная, что неприемлемо для короткоживущих медицинских радионуклидов. В связи с этим, оптимальные температура и время, необходимые для связывания катионов, определяются на первых этапах исследования. 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. Эти значения были взяты из литературы для аналогичных соединений вместе с результатами наших предварительных экспериментов.

При проведении реакции комплексообразования при  $37^\circ\text{C}$  степень мечения  $\text{DOTA-P1}$  для всех катионов составлял 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  $60^\circ\text{C}$ . При этом комплексообразование  $\text{Vi}^{3+}$  гораздо более медленное в начале нагревания (Рис.27), что, очевидно, связано с его высокой склонностью к гидролизу (константы гидролиза  $\text{Vi}^{3+}$  на шесть и три порядка выше, чем у  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{Sc}^{3+}$  соответственно). При  $37^\circ\text{C}$  степень мечения от 90 до 95% может быть достигнута только в течение 1 суток. Идентичность меченых соединений при разных температурах подтверждается совпадением значений  $R_f$  и формы пятна на автордиограммах ТСХ. Последнее указывает и на стабильность пептидного конъюгата при нагревании выше  $37^\circ\text{C}$ .

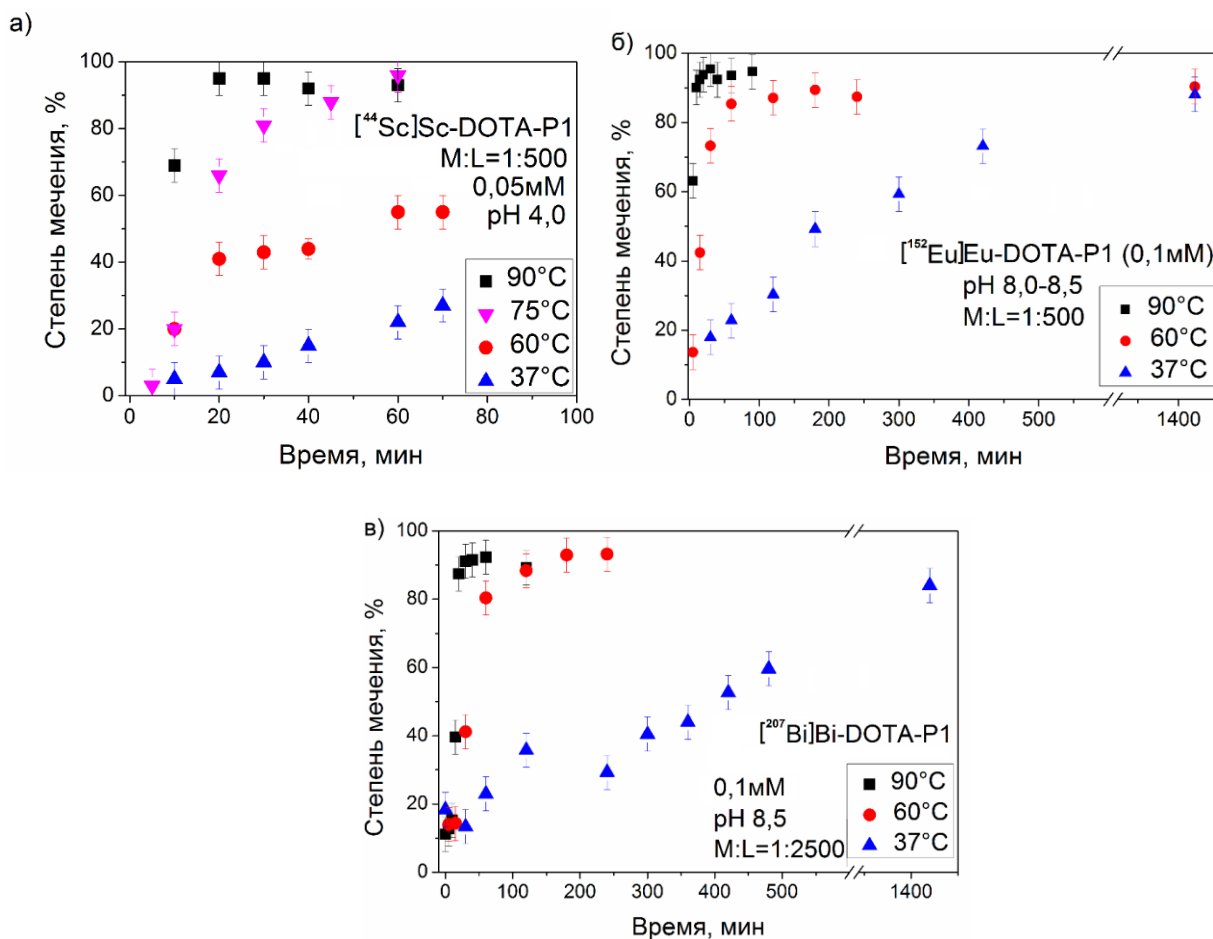


Рис.27. Зависимость степени мечения DOTA-P1 от времени при различных температурах катионами: а)  $^{44}\text{Sc}$ , б)  $^{152}\text{Eu}$  в)  $^{207}\text{Bi}$ .

Для сравнения мы провели мечение  $\text{H}_4\text{DOTA}$  исследуемыми радионуклидами в тех же условиях. Было показано, что при  $c(\text{DOTA}) = 100 \text{ мкМ}$  и  $T = 90^\circ\text{C}$  степень мечения от 98% до 99% может быть достигнута в течение 5 минут. Наблюдаемая разница в мечении DOTA до и после конъюгации с пептидом, а также замедление комплексообразования может быть связано с меньшим числом хелатирующих групп (одна карбоксильная группа участвует в конъюгации) и более низкой стереохимической доступностью макроцикла хелатора, связанного с пептидом, по сравнению со свободной DOTA.

В радиофармацевтической практике важно получить соединение с наивысшей удельной активностью, поэтому необходимо определить самое высокое соотношение  $M:L$ , которое будет использоваться для достаточного комплексообразования. Очевидно, что увеличение концентрации лиганда вызывает более быстрое мечение, что было показано на примере комплекса  $\text{Sc-DOTA-P1}$  (Рис.28).

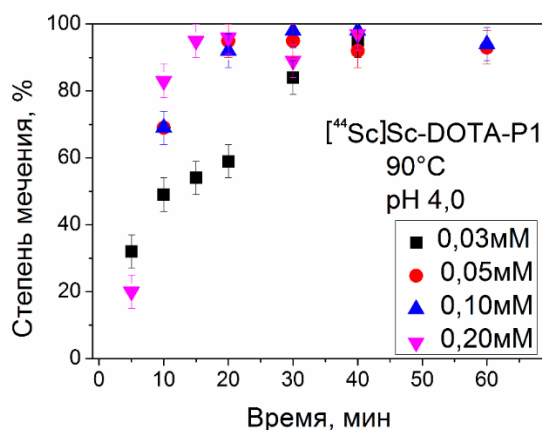


Рис.28. Зависимость степени мечения DOTA-P1 катионами  $^{44}\text{Sc}^{3+}$  от времени при различных концентрациях DOTA-P1.

Согласно этим зависимостям, 1-часовой нагрев до  $90^{\circ}\text{C}$  должен дать корректные результаты для оценки наиболее подходящего соотношения M:L. Эффективность мечения для различных соотношений M:DOTA-P1 для катионов  $^{152}\text{Eu}$  и  $^{207}\text{Bi}$  была определена после 1-часовой выдержки при  $90^{\circ}\text{C}$  (Таблица 12). Можно сделать вывод, что концентрация лиганда 0,1 мМ достаточна для 93-95% хелатирования  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ , тогда как для  $\text{Sc}^{3+}$  высокий выход мечения достигается уже при концентрации конъюгата 0,05 мМ. Это соответствует литературным данным по мечению DOTATATE катионами  $^{44}\text{Sc}^{3+}$  и в 20 раз выше, чем требуется в случае  $^{213}\text{Bi}$  [160],[161].

Таблица 12. Степень мечения DOTA-P1 от времени при различных концентрациях DOTA-P1 катионами  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{152}\text{Eu}$  и  $^{207}\text{Bi}$ .

с(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
0,05 мМ	1:500	95±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

Принимая во внимание, что протонирование лиганда, а также гидролиз катионов зависит от pH, важно также найти оптимальное значение pH для процесса комплексообразования.

Полное депротонирование лиганда  $H_4DOTA$  происходит только при  $pH > 11$  (Рис. П1а) [162]. Известно, что медленная кинетика комплексообразования с  $H_4DOTA$  связана с медленным депротонированием амино-групп в  $H_4DOTA$  и их замещением катионом (Рис.29) [163]. Так было показано, что при  $pH$  от 2,3 до 2,6 степень мечения  $DOTA-P1$  составляет не более 17% для  $Bi^{3+}$  и 11% для  $Eu^{3+}$  (Рис. 30в,г). Для  $Bi^{3+}$  и  $Eu^{3+}$  повышение  $pH$  увеличивает максимальный выход мечения; при более высоком  $pH$  происходит более быстрое связывание катиона (Рис. 30в, г) [164].

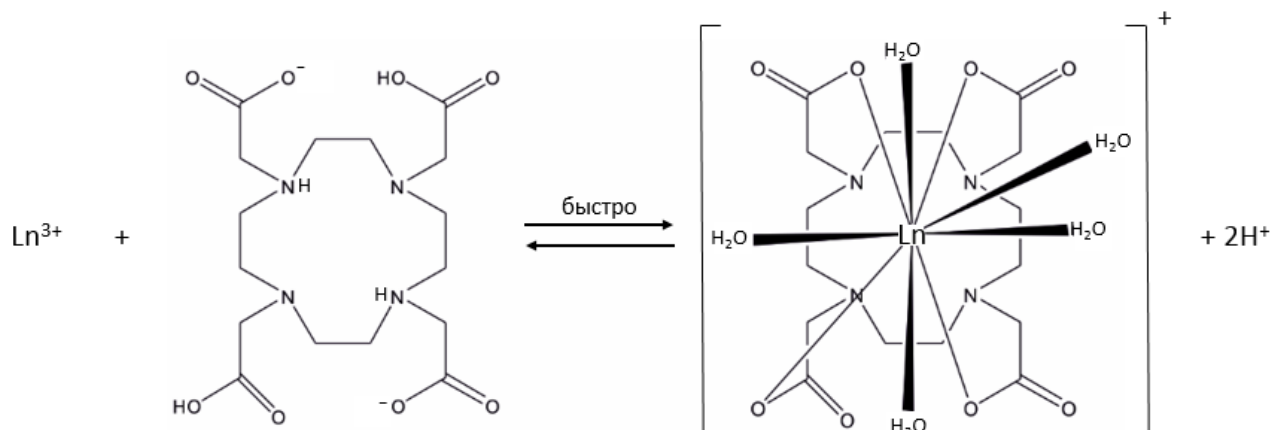


Рис.29. Механизм образования комплекса Ln-DOTA.

Интересно, что для катиона скандия самый высокий выход реакции мечения был получен при  $pH$  от 4,0 до 5,0 (Рис. 30а). 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  $Sc^{3+}$  [113,165,166]. Будучи наименьшим из  $PЗЭ^{3+}$ , он является самым жестким среди них и демонстрирует гораздо более высокие константы гидролиза, чем другие, даже  $Y^{3+}$  ( $\log\beta_{ScOH} = -4,3$ ,  $\log\beta_{EuOH} = -8,0$  и  $\log\beta_{YOH} = -7,7$ ) [156,157]. С этой точки зрения  $Sc^{3+}$  занимает промежуточное положение между  $Bi^{3+}$  (сильно гидролизуемый катион,  $\lg\beta_{BiOH} = -1,1$ ) и  $Eu^{3+}$  (гораздо менее гидролизуемый катион среди исследуемых). Отсутствие такой же тенденции для  $Bi^{3+}$  может быть следствием более высокой константы стабильности комплекса  $Bi-DOTA$  по сравнению с  $Sc-DOTA$  ( $\log K_{Bi-DOTA} = 30$ ,  $\log K_{Sc-DOTA} = 27$ ). Для иттрия наблюдается отсутствие какого-либо влияния  $pH$  раствора на процесс мечения: высокие степени мечения достигаются уже в течение 10 мин как при  $pH$  3,8, так и при  $pH$  8,2 (Рис.30б), что может быть связано с умеренной гидролизуемостью иттрия.

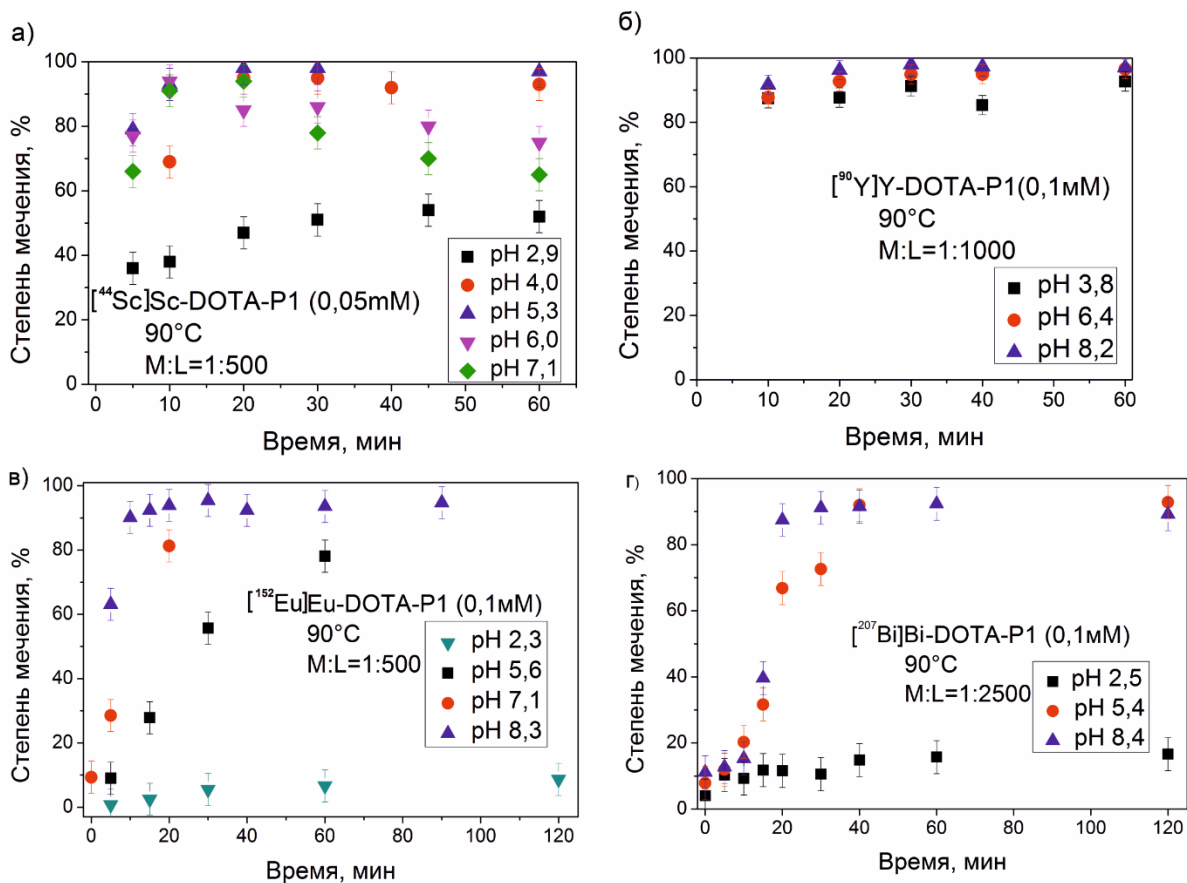


Рис.30. Зависимость степени мечения DOTA-P1 от времени при различном значении pH раствора катионами: а)  $^{44}\text{Sc}$ , б)  $^{90}\text{Y}$ , в)  $^{152}\text{Eu}$  в)  $^{207}\text{Bi}$ .

Кроме того, мы наблюдали образование промежуточных форм комплексов  $\text{M-H}_x\text{DOTA-P1}$  согласно предложенному в литературе механизму: сначала при околонейтральном pH образуется протонированный комплекс, который постепенно депротонируется. Это было продемонстрировано методом ТСХ Bi-DOTA-P1 (Рис. 31) и Eu-DOTA-P1 (Рис. П2) и последующей автордиографией пластин. Формы  $\text{Bi-H}_x\text{DOTA-P1}$  образуются сразу в первые минуты реакции ( $R_f = 0,2-0,4$ ). Затем протоны на аминогруппах вытесняются катионом, и  $\text{Bi-H}_x\text{DOTA-P1}$  превращается в  $\text{Bi-DOTA-P1}$  ( $R_f = 0,6-0,7$ ). Присутствие этого протонированного комплекса хорошо иллюстрируется на автордиографическом изображении ТСХ пластин при pH 2,6: основные формы, содержащие  $\text{Bi}^{3+}$ , локализируются в области  $R_f = 0,2-0,4$  как через 5 минут, так и через 1 час после начала реакции. При этом  $R_f$ , полученный для образца при более высоком pH и длительном выдерживании, можно отнести к конечному депротонированному комплексу.

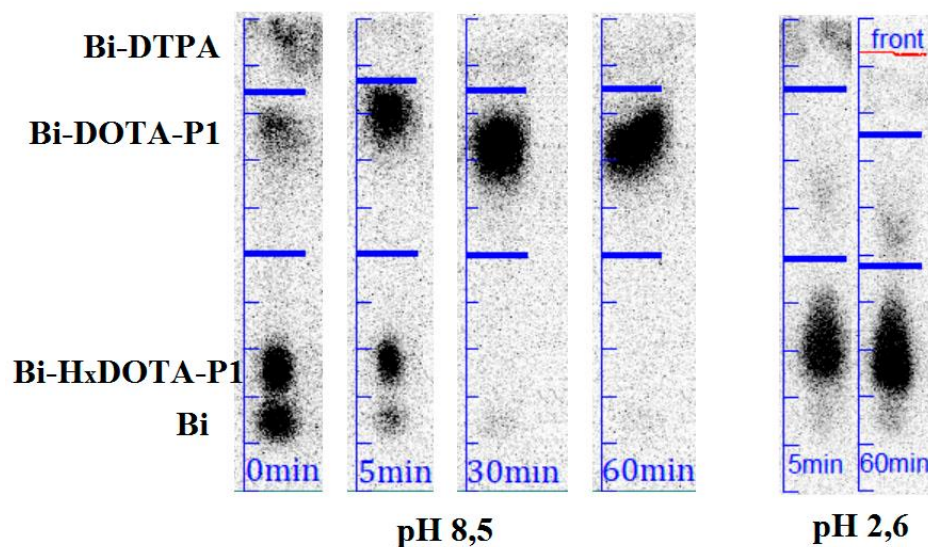


Рис.31. Авторадиограммы пластин ТСХ [ $^{207}\text{Bi}$ ]Bi-DOTA-P1.

ВЭЖХ для комплекса Eu-DOTA-P1 демонстрирует только один пик на кривой поглощения (УФ-детектор), совпадающий по времени с выходом  $^{152}\text{Eu}$ -содержащих фракций, что подтверждает образование комплекса Eu-DOTA-P1 (Рис. 32).

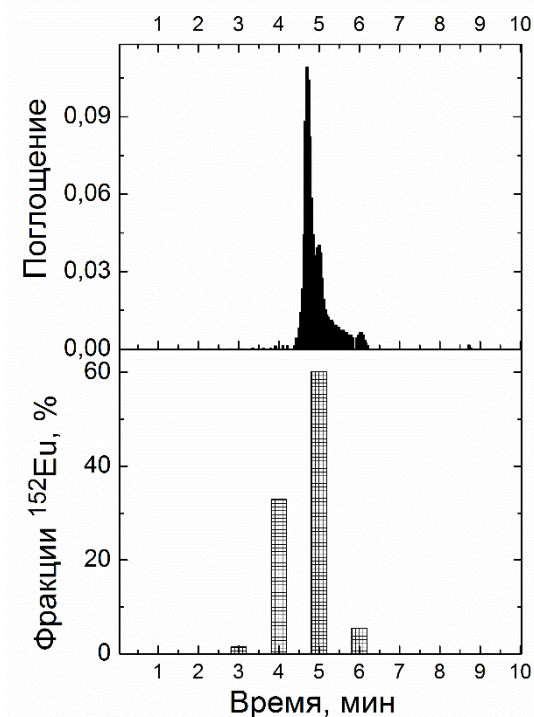


Рис. 32. ВЭЖХ хроматограмма комплекса [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P1.

### 3.3. Мечение DOTA-P2

DOTA-P1 и DOTA-P2 различаются наличием аминокислоты тиопролина (или тиазолидина) (Thz) между хелатором и последовательностью Phe-D-Trp-Lys-Thr:



DOTA-P1: DOTA-Phe-D-Trp-Lys-Thr

DOTA-P2: DOTA-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr

Добавление Thz основано на том, что Thz является защищенной версией Cys (входящего в состав соматостатина и его аналогов), при этом Thz сам обладает цитотоксическими свойствами. В первую очередь мы попытались пометить DOTA-P2, используя уже подобранные условия для DOTA-P1, однако это удалось только для  $^{44}\text{Sc}$  и  $^{90}\text{Y}$ . В случае  $^{44}\text{Sc}$  при низком pH наблюдались только протонированные формы комплекса, то есть Sc-H<sub>x</sub>DOTA-P2 с R<sub>f</sub> = 0,2-0,4. Наибольшая степень мечения составила 97% при T = 90°C в течение 20 минут при концентрации 0,2 мМ (Рис. 33). Более медленная кинетика связывания  $^{44}\text{Sc}$  с DOTA-P2 может быть связана с присутствием пятой аминокислоты в непосредственной близости от хелатора, что может снизить его стерическую доступность для катиона. Влияние pH раствора показывает ту же зависимость, что и в случае DOTA-P1.

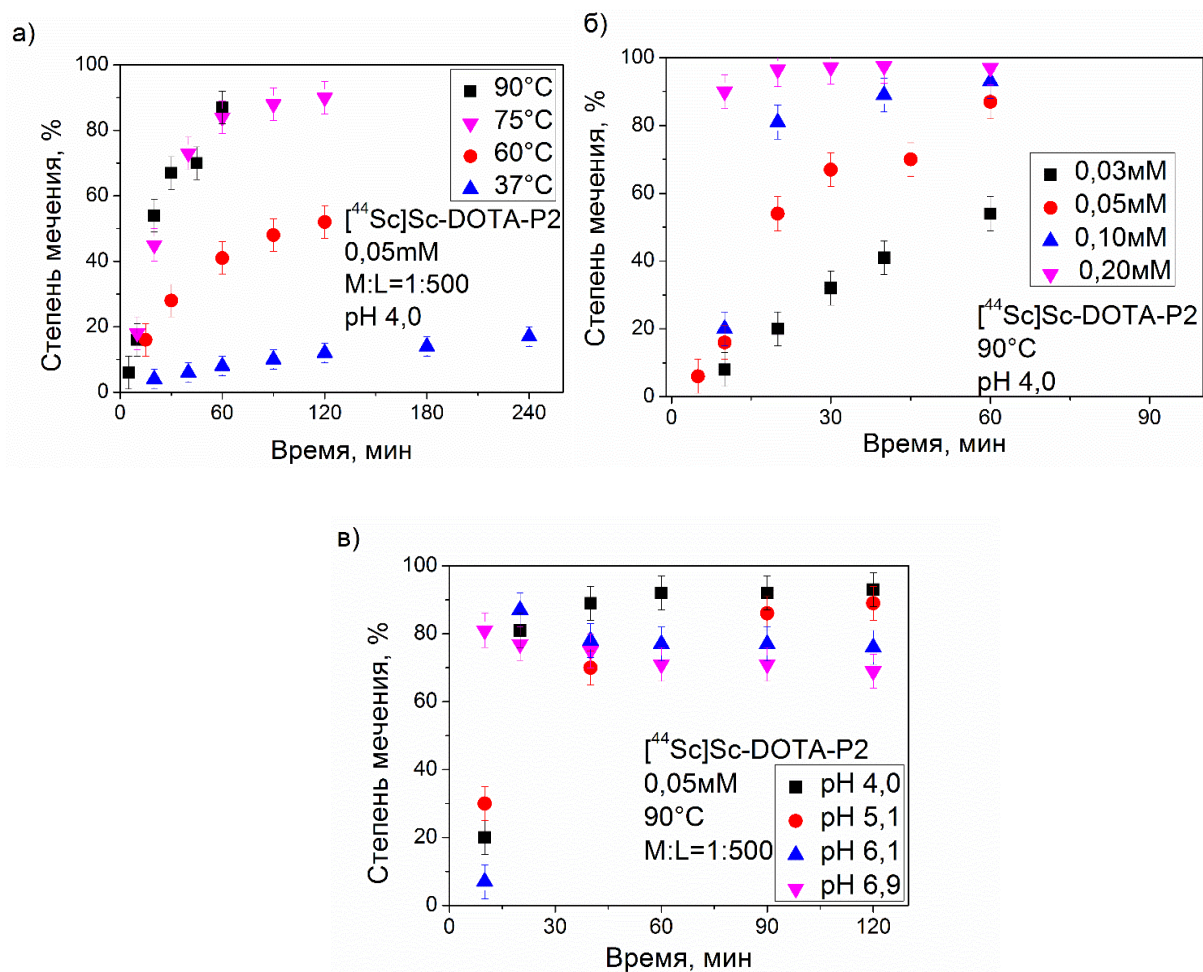


Рис. 33. Зависимость степени мечения DOTA-P2 катионами  $^{44}\text{Sc}$  от времени при различных: а) температурах, б) концентрациях DOTA-P2, в) pH раствора.

Для Y-DOTA-P2 в процессе комплексообразования наблюдаются те же тенденции, что и для Sc: оптимальным является значение pH 4, а с ростом pH раствора доля комплекса уменьшается из-за гидролиза катиона иттрия, а также, возможно, меньшей константы устойчивости комплекса Y-DOTA-P2 по сравнению с Y-DOTA-P1 (Рис.34).

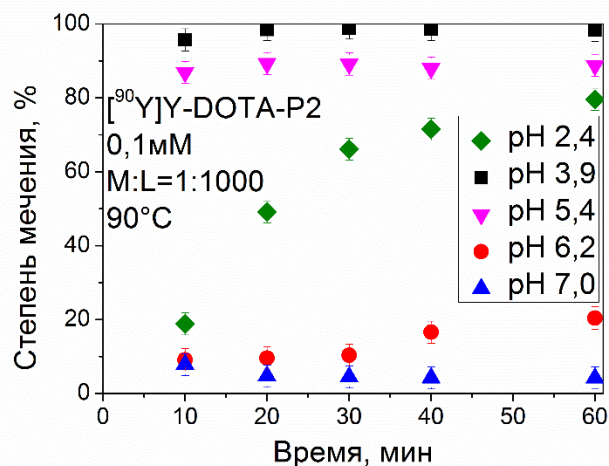


Рис.34. Зависимость степени мечения DOTA-P2 катионами  $^{90}\text{Y}$  от времени при различных значениях pH раствора.

Иная ситуация наблюдается с катионами  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ , оказалось, что выбранные условия мечения для комплекса DOTA-P1 не подходят для комплексов с DOTA-P2. Мечение DOTA-P2 катионами  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$  не только медленнее, но и при значениях pH от 8,0 до 8,4 конкурирует с гидролизом как катионов, так и самих пептидов. Более того, повышение температуры, по-видимому, в разной степени усиливает все эти процессы (комплексообразования и гидролиза) (Рис. 35). В результате мы наблюдали монотонное снижение эффективности мечения при повышении температуры реакции.

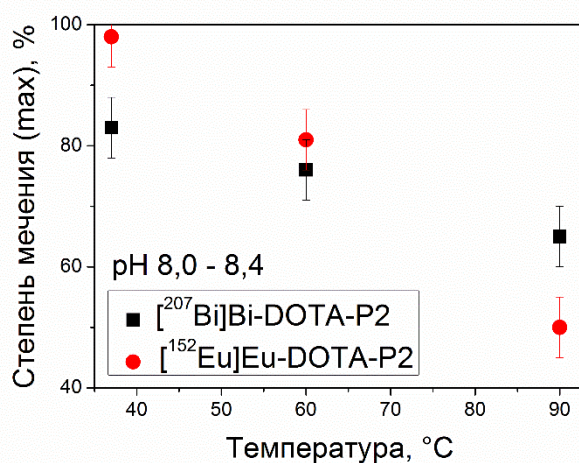


Рис.35. Максимальная степень мечения DOTA-P2 катионами  $^{207}\text{Bi}$  и  $^{152}\text{Eu}$  при разных температурах: 90°C (30 мин), 60°C (2 ч) и 37°C (4 д).



Помимо очевидного гидролиза катионов, длительная инкубация DOTA-P2 в щелочной среде, очевидно, вносит большой вклад в гидролиз пептидных связей. 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. Уменьшение pH реакции также не привело к повышению выхода целевых комплексов. Наилучшие результаты для DOTA-P2 были получены при pH 8 в течение нескольких суток (Рис. 36).

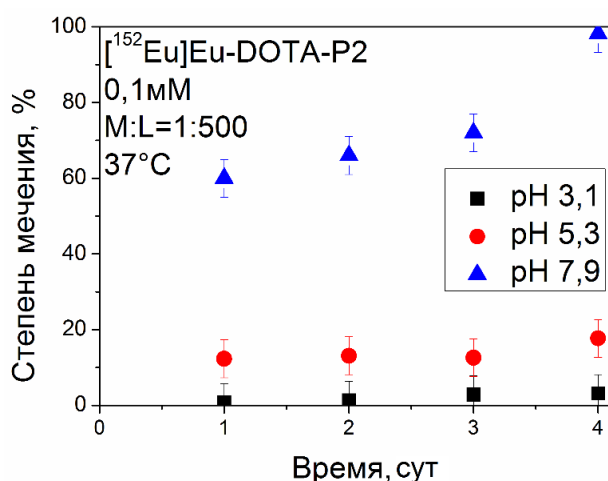


Рис. 36. Зависимость степени мечения DOTA-P2 катионами  $^{152}\text{Eu}$  от времени при различных значениях pH раствора.

Чтобы подтвердить возможное разрушение DOTA-P2, мы провели масс-спектрометрический анализ комплексов DOTA-P1 и DOTA-P2. Масс-спектры Eu-DOTA-P1 (Рис. 37а) указывают только на присутствие комплексов пептид-кислота (967,7), пептид-сложный эфир (981,7) и комплексов европия с пептидом-кислотой (1117,5) и пептидом-эфиром (1131,6). Масс-спектры образцов Eu-DOTA-P2 в (90°C, 15 мин) (Рис. 37б) и г (25°C, 7 сут) (Рис. 37в) демонстрируют присутствие комплекса европия с пептидом-кислотой (1232,5), самим пептидом-кислотой (1082,8), Na-солью пентапептида-кислоты (1144,5) и другие более мелкие фрагменты. Масс-спектры других образцов Eu-DOTA-P2 (с - 90°C, 30 мин, d - 90°C, 60 мин, е - 90°C, 1,3 ч и f - 37°C, 4 д) демонстрируют аналогичные сигналы, но разные соотношения пиковых интенсивностей.

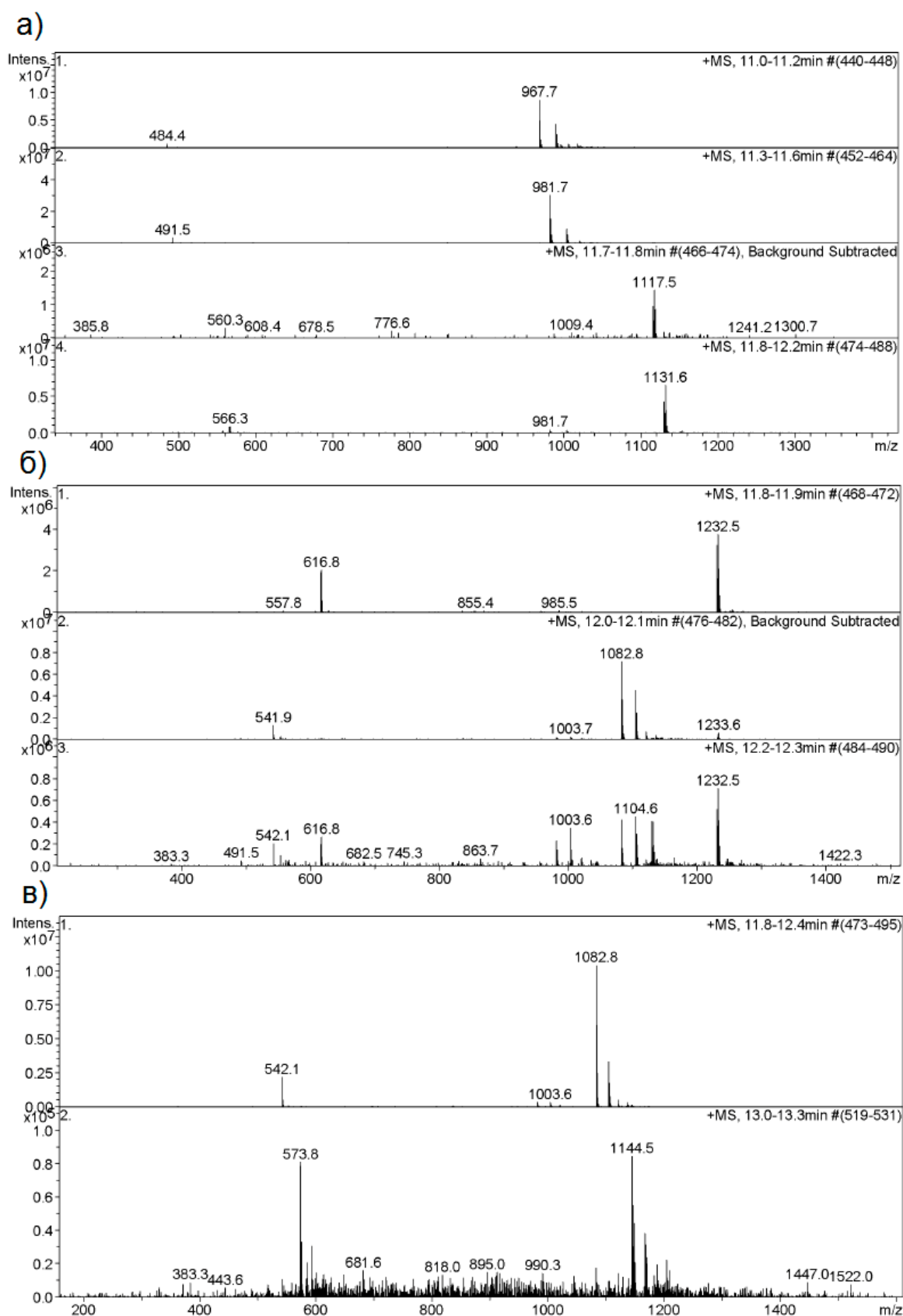


Рис.37. Масс-спектры для комплексов а) Eu-DOТА-P1 ( $T = 90^{\circ}\text{C}$ , 30 мин), б) Eu-DOТА-P2 ( $T = 90^{\circ}\text{C}$ , 15 мин), в) Eu-DOТА-P2 ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ , 7 д).

Для анализа комплексов с DOTA-P2 была также использована ВЭЖХ (Рис. П3 и П4). Время выхода конъюгата DOTA-P2 составило  $7,0 \pm 0,1$  мин. Из полученных хроматограмм видно, что с ростом температуры синтеза в первые минуты с колонки начинает выходить вторая фракция, отличная от исходного DOTA-P2. Наличие дополнительных сигналов в масс-спектре Eu-DOTA-P2 по сравнению с Eu-DOTA-P1, а также результаты ВЭЖХ подтверждают наше предположение о том, что DOTA-P2 сам по себе менее химически стабилен.

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  $T = 37-40^\circ\text{C}$  в течение 4 суток (Рис. 36). 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.

### 3.4. Мечение L-P1

Ранее бензоазакраун-лиганд L исследовался в нашей лаборатории и зарекомендовал себя как хелатор, образующий устойчивые комплексы с катионами висмута уже при комнатной температуре [167]. 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 высоких температур для комплексообразования по сравнению с DOTA-P1 и даже при pH 3 достигается степень мечения 80%, что было подтверждено результатами ТСХ и ВЭЖХ (Рис.38 и Рис.П5а). Можно заключить, что мечение конъюгата L-P1 практически не зависит от pH и температуры, и в качестве оптимальных параметров были выбраны комнатная температура, pH 6,0-8,0, концентрация лиганда 0,07 мМ.

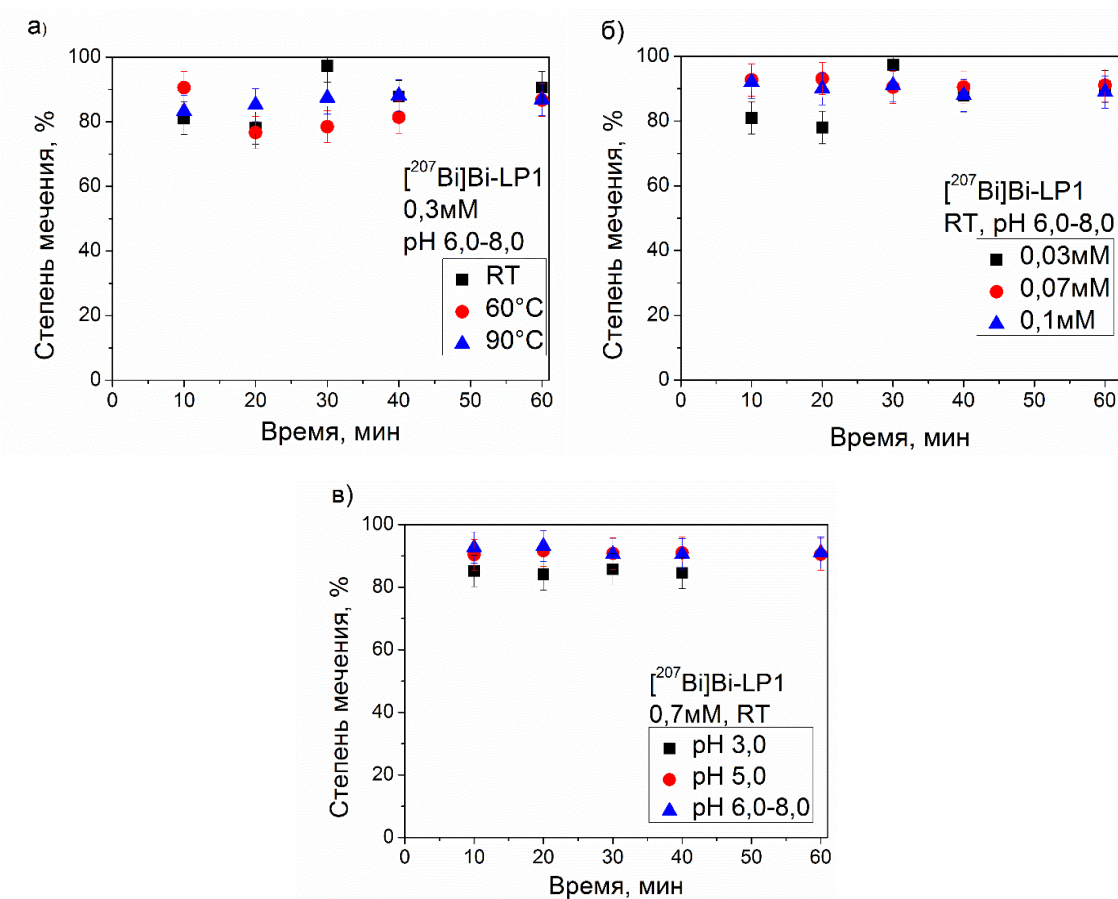


Рис. 38. Зависимость степени мечения L-P1 катионами  $^{207}\text{Bi}$  от времени при различных: а) температурах, б) концентрациях L-P1, в) pH раствора.

### 3.5. 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. Конъюгат DOTA-P4 отличается от DOTA-P2 положением хелатора DOTA: в DOTA-P4 он связан с пептидной цепью с противоположного конца, а именно с аминокислотой Thr:

DOTA-P2: **DOTA**-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr

DOTA-P4: Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-**DOTA**

Мечение DOTA-P4 катионами  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{90}\text{Y}$  и  $^{152}\text{Eu}$  проводили аналогично с добавлением носителя. Для  $^{207}\text{Bi}$  носитель не добавлялся из-за достаточно высокой концентрации катионов  $^{207}\text{Bi}$  (0,04 мкМ) в конечном растворе. Удельная активность меченых молекул DOTA-P4 составляла 16-42 кБк/мг или 1,8-4,8 кБк/мл.

Поскольку результаты наших предварительных экспериментов с DOTA-P1 и DOTA-P2 показали, что 90°C является оптимальной температурой для мечения

пептидных конъюгатов короткоживущими медицинскими 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, такими как  $^{44}\text{Sc}^{3+}$  и  $^{90}\text{Y}^{3+}$ , протекает аналогично процессам мечения DOTA-P1 и DOTA-P2. Однако среда, в которой  $^{44}\text{Sc}^{3+}$  выходит после стадии очистки элюата с генераторной колонки (pH 4, 0,5 М буфер  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ), оказалась не совсем пригодной для количественного мечения конъюгата: степень мечения 93-95% была достигнута только в течение 40 мин. Более того, увеличение концентрации пептида до 0,2 мМ не приводило к более высокому выходу мечения, в то время как увеличение pH раствора до 5 способствовало достижению степени мечения 94% в течение 20 мин (Рис.39). Дальнейшее увеличение значения pH не проводилось в силу склонности скандия к гидролизу (Рис.П1б). Для  $^{90}\text{Y}^{3+}$  оптимальные условия мечения (pH 4, 0,1 мМ DOTA-P4) были такими же, как для  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-P2.

Из-за разницы химических структур DOTA-P2 и DOTA-P4 (та же аминокислотная последовательность, но другое положение конъюгации DOTA), мы ожидали различий в процессе мечения для «больших» катионов  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{Bi}^{3+}$  в соответствии с нашей гипотезой о стерически меньшей доступности DOTA в DOTA-P2. Для  $\text{Eu}^{3+}$  оптимальные условия мечения (pH 8, 0,2 мМ DOTA-P4) аналогичны условиям для  $\text{Eu}$ -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 Thz-аминокислоты вблизи хелатирующего агента в процессе комплексообразования. Результаты мечения подтверждаются ВЭЖХ (Рис.П5б).

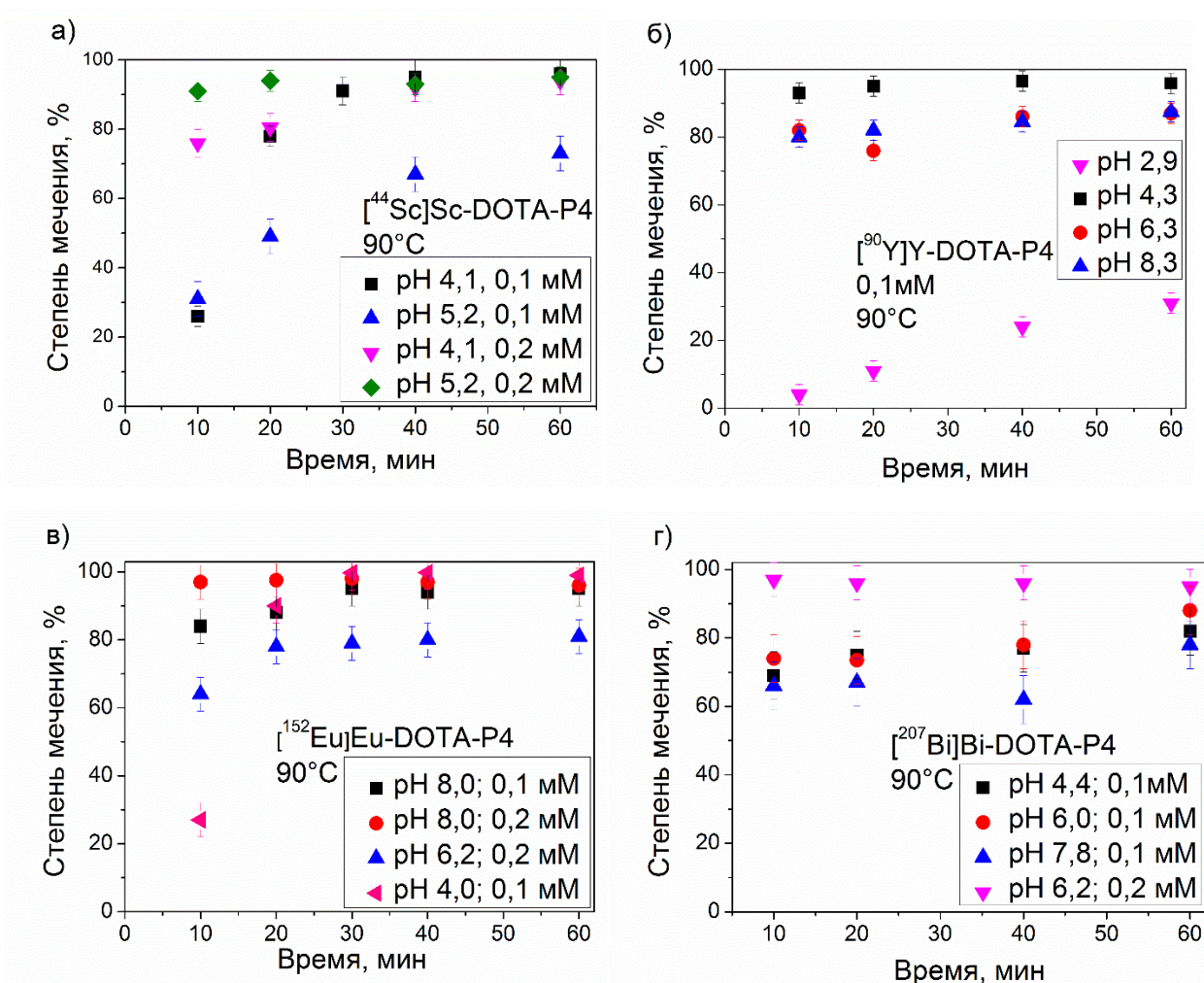


Рис.39. Зависимость степени мечения DOTA-P4 от времени катионами: а) <sup>44</sup>Sc, б) <sup>90</sup>Y, в) <sup>152</sup>Eu в) <sup>207</sup>Bi.

Доступность хелатирующего агента для катиона может коррелировать с площадью поверхности молекулы, доступной для растворителя (SASA), в целом, для внешних агентов, в том числе и для катионов радионуклидов. Результаты расчета траекторий, полученных методом молекулярной динамики, позволили оценить площадь поверхности DOTA в составе трех пептидных конъюгатов (Рис.40). 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.



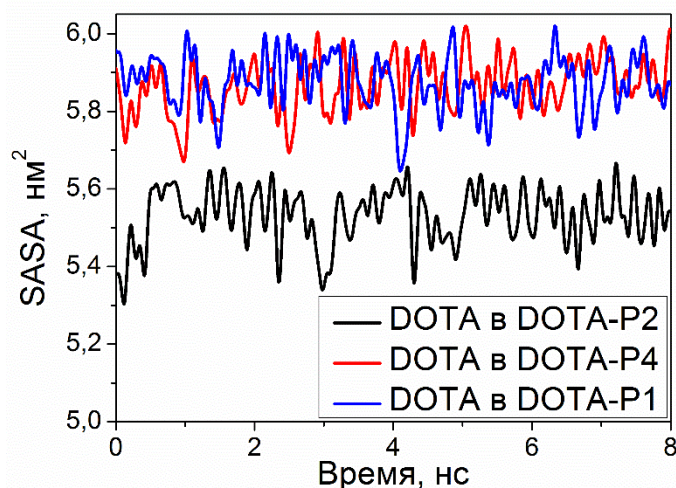


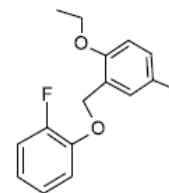
Рис. 40. Площадь поверхности фрагментов DOTA в составе пептидных конъюгатов, доступная для растворителя.

### 3.6. Мечение DOTA-P3

Химическая структура конъюгата DOTA-P3 аналогична DOTA-P4 за исключением дополнительного фрагмента, связанного с аминокислотой Thz и находящегося в максимальном удалении от хелатора DOTA:

DOTA-P4: Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA

DOTA-P3: X-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA, X = Fpom = 2-(3-((2-фторфенокси)-метил)-4-метоксифенил)



Предположительно, такой Fpom-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  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{Bi}^{3+}$  (рис.41). Вероятно, константы устойчивости комплексов  $[\text{M-DOTA-P3}]$  в целом меньше, чем аналогичные комплексы с другими конъюгатами, и при значениях pH >6 процессы гидролиза катионов начинают доминировать над процессом комплексообразования.

В таблице 13 сведены все условия, подобранные в данной работе для комплексов металлов с пептидными конъюгатами. Из представленных только результаты для Eu-DOTA-P2 и Bi-DOTA-P2 не отвечают очевидным требованиям, предъявляемым для синтеза радиофармпрепаратов (слишком длительное время реакции).

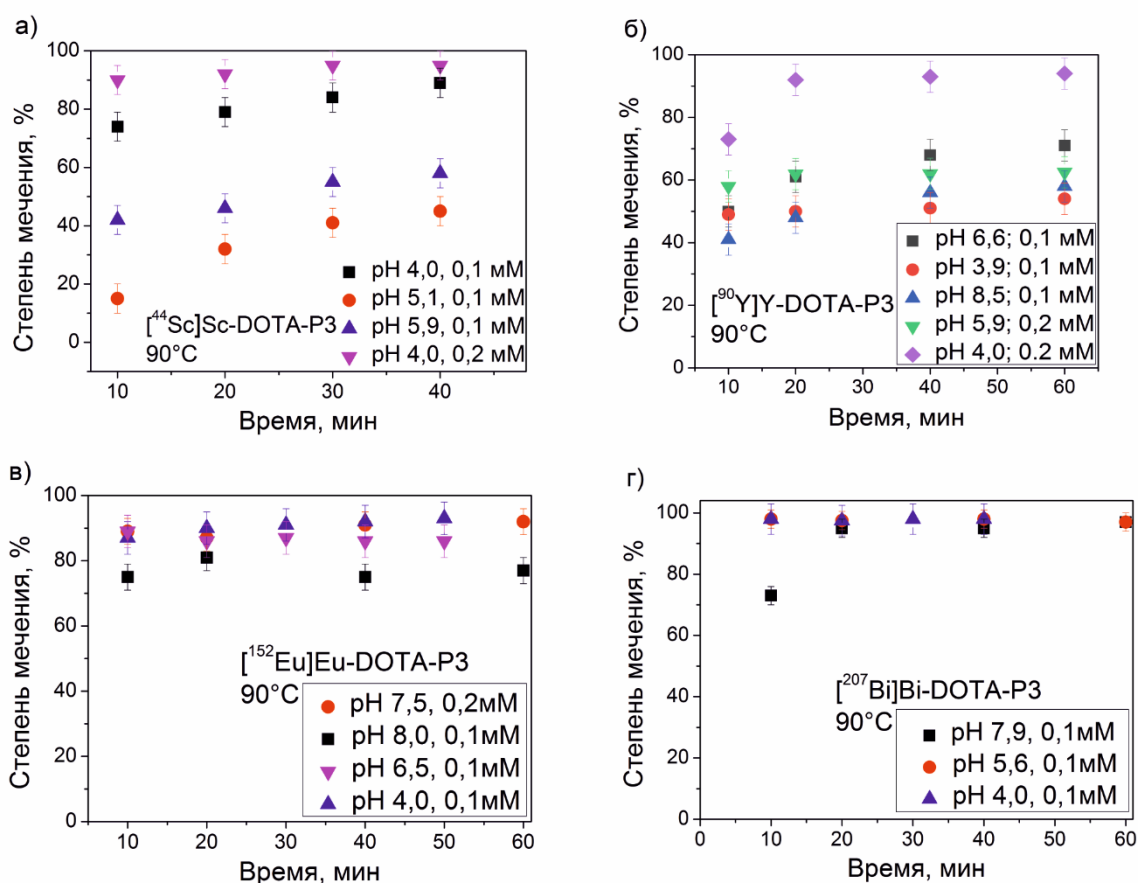


Рис. 41. Зависимость степени мечения DOTA-P3 от времени катионами: а)  $^{44}\text{Sc}$ , б)  $^{90}\text{Y}$ , в)  $^{152}\text{Eu}$  в)  $^{207}\text{Bi}$ .

Таблица 13. Оптимальные условия мечения для комплексов M-DOTA-P и Bi-L-P1.

$\text{M}^{3+}$	DOTA-P1	L-P1	DOTA-P2	DOTA-P3	DOTA-P4
$^{44}\text{Sc}^{3+}$	$5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ , pH 4,0-4,5, $90^\circ\text{C}$ , 20-30 мин	-	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 4,0-4,5, $90^\circ\text{C}$ , 20 мин	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 4,0, $90^\circ\text{C}$ , 20 мин	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 5,0, $90^\circ\text{C}$ , 20 мин
$^{90}\text{Y}^{3+}$	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 6,4-8,4, $90^\circ\text{C}$ , 20-30 мин	-	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 3,9-4,1, $90^\circ\text{C}$ , 10-20 мин	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 4,0-6,0, $90^\circ\text{C}$ , 20 мин	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 4,0, $90^\circ\text{C}$ , 20 мин
$^{152}\text{Eu}^{3+}$	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 8,0-8,4, $90^\circ\text{C}$ , 20-30 мин	-	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 8,0-8,4, $37^\circ\text{C}$ , 4 д	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 4,0-6,0, $90^\circ\text{C}$ , 20 мин	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 8,0-8,4, $90^\circ\text{C}$ , 10 мин
$^{207}\text{Bi}^{3+}$	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 8,0-8,4, $90^\circ\text{C}$ , 20-30 мин	$2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ , pH 6,0-8,0, $25^\circ\text{C}$ , 20-30 мин	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 8,0-8,4, $37^\circ\text{C}$ , 4 д	$1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 4,0-6,0, $90^\circ\text{C}$ , 10 мин	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , pH 6,0, $90^\circ\text{C}$ , 10 мин



## Глава 4. Стабильность меченных комплексов в условиях *in vitro*

Для того, чтобы доза ионизирующего излучения была доставлена максимально эффективно, радиофармацевтический препарат не должен разрушаться в процессе приготовления (быть устойчивым в физиологическом растворе), а также претерпевать перехелатирование с белками и биогенными катионами в составе плазмы крови. Для оценки стабильности исследуемых комплексов в условиях *in vitro* использовали комплексы M-DOTA-P с радиохимической чистотой от 95% до 98%.

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

1. Yakusheva A.O., Titchenko N.A., Egorova B.V., Matazova E.V., Podkhalyuzina N.Ya., Osipov V.N., Khachatryan D.S., Avdeev D.V., 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.
2. Fedotova 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.

### 4.1. Стабильность в сыворотке

Радиоактивную фракцию, перехелатированную белками сыворотки, определяли за счет разделения белков сыворотки путем их осаждения этанолом. Полноту осаждения белков в маточном растворе проверяли с помощью метода Бредфорда: готовили образцы сыворотки, разбавленные в 10, 100, 1000 и 10000 раз, добавляли к ним реагент Бредфорда и измеряли оптическое поглощение при 595 нм. Аналогичную процедуру повторяли с образцом маточного раствора после осаждения белка, разбавленным в 10 раз. Оказалось, что оптическое поглощение такого образца маточного раствора совпадает с поглощением раствора сыворотки, разбавленного в 10000 раз, соответственно, можно говорить о том, что как минимум 99,9% белков было осаждено. Неразбавленные маточные растворы дополнительно анализировались с помощью биуретовой реакции, результаты были отрицательные.

Полученные результаты измерения радиоактивности маточных растворов демонстрируют, что при 100-кратном избытке фетальной бычьей сыворотки (пептид разбавлен до 1 мкМ) наблюдается высвобождение от 10% до 20% катиона из комплексов M-DOTA-P (P=P1, P2, P4) в течение 30-60 минут (Рис.42). После 1 дня инкубации увеличения доли катиона, связанного с белком, не происходит. Из четырех DOTA-конъюгатов наибольшую стабильность демонстрируют комплексы M-DOTA-P4 (более 85% в течение 24 ч). Комплекс  $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-P3}$ , наоборот, показал наименьшую стабильность из всех рассматриваемых комплексов: 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  $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-P3}$  часть катионов висмута связывается не с DOTA, а координируется концевым F-фрагментом и легко перехелатируется белками сыворотки.

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.

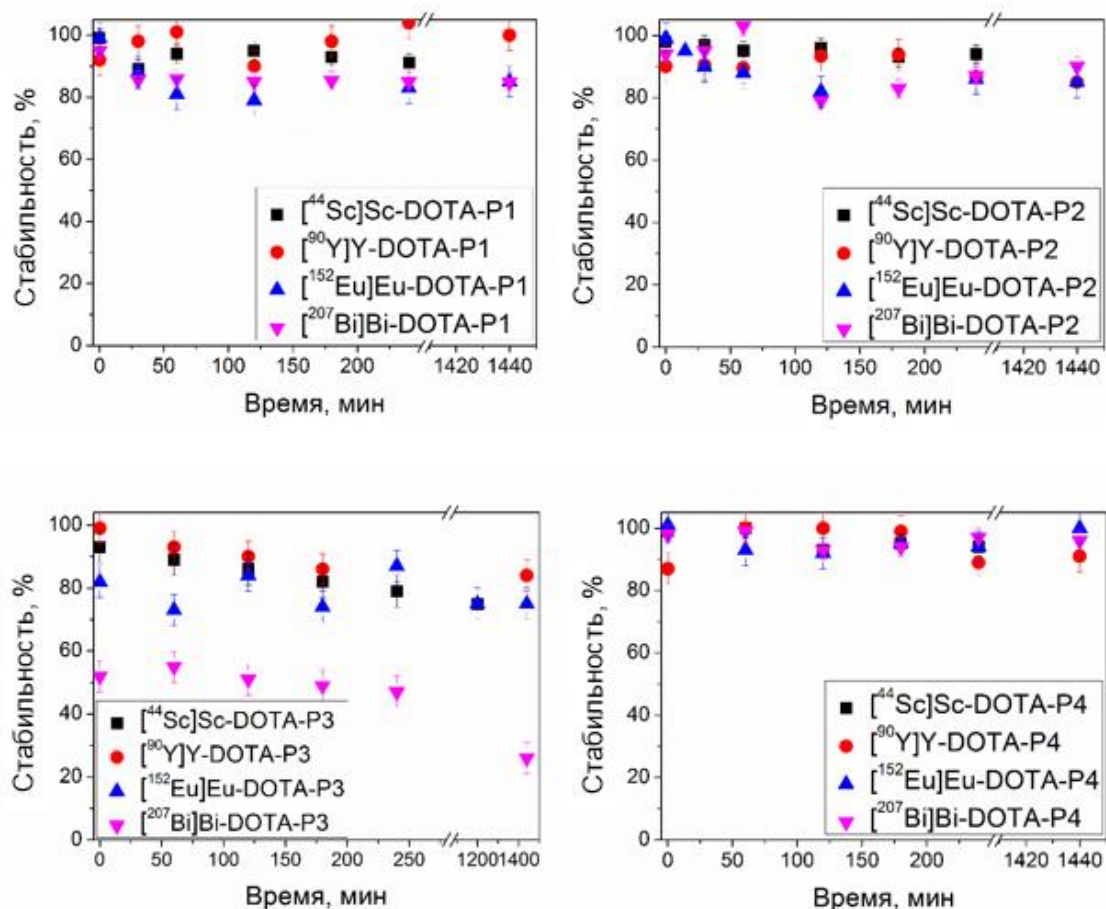


Рис. 42. Стабильность в сыворотке для комплексов M-DOTA-P.

На стабильность в сыворотке был также проверен комплекс Bi-L-P1 (Рис.43) Оказалось, что высвобождение 50% катиона происходит быстрее, чем в случае комплекса BiL, в течение 1 часа. Однако далее быстрой диссоциации не наблюдается. Идентификацию несвязанной с сывороткой фракции проводили методом ТСХ, что подтверждало, что не связанный с сывороткой радионуклид находится в составе комплекса Bi-L-P1.

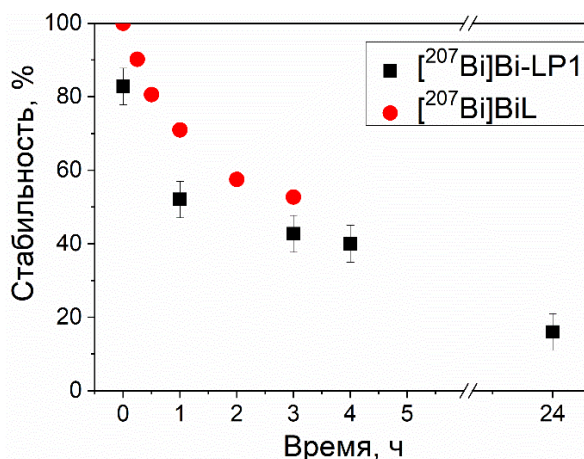


Рис. 43. Стабильность комплексов Bi-L-P1 и Bi-L в присутствии сывороточных белков.

В любом случае, конъюгат L-P1 не демонстрирует высокой стабильности получаемых комплексов, поэтому в рамках данной работы далее рассматривались только DOTA-пептиды.

#### 4.2. Стабильность 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 14-15).

Таблица 14. Стабильность комплексов [M]M-DOTA-P1 и [M]M-DOTA-P2 при 37°C в физиологическом растворе и в присутствии катионов металлов в течение 4 ч.

	0,9% NaCl	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
[ <sup>44</sup> Sc]Sc-DOTA-P1	95	96	97	98	98	90
[ <sup>90</sup> Y]Y-DOTA-P1	96	99	98	99	97,5	96
[ <sup>152</sup> Eu]Eu-DOTA-P1	95	91	94	92	95	88
[ <sup>44</sup> Sc]Sc-DOTA-P2	97	96	95	97	97	90
[ <sup>207</sup> Bi]Bi-DOTA-P2	89	82	90	84	82	79
[ <sup>90</sup> Y]Y-DOTA-P2	90	93	95	92	97	92

Таблица 15. Стабильность комплексов [M]M-DOTA-P4 и [M]M-DOTA-P3 при 37°C в физиологическом растворе и в присутствии катионов металлов в течение 24 ч (4 ч для  $^{44}\text{Sc}$ ).

	0,9% NaCl	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
[ $^{44}\text{Sc}$ ]Sc-DOTA-P4	90,5	89,5	92	91	93,5	89
[ $^{90}\text{Y}$ ]Y-DOTA-P4	92	93,5	94	92	91,5	88
[ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P4	92	95,5	94	91,5	93	90
[ $^{207}\text{Bi}$ ]Bi-DOTA-P4	97	94	95	94	93	92
[ $^{44}\text{Sc}$ ]Sc-DOTA-P3	86	81	84	82	84	85
[ $^{90}\text{Y}$ ]Y-DOTA-P3	99	100	99	98	99	100
[ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P3	87	86,5	93	86	95	94
[ $^{207}\text{Bi}$ ]Bi-DOTA-P3	96	97,5	95	96	96	97

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), стабильность исследуемых комплексов остается высокой и достаточной для применения рассматриваемых соединений в составе РФП (исключение – [ $^{207}\text{Bi}$ ]Bi-DOTA-P3).

## Глава 5. Анализ сродства 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 2 и 5 типов.

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Fedotova 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.

### *5.1. Анализ сродства исследуемых конъюгатов коротких пептидов DOTA-P к рецепторам соматостатинового ряда с помощью расчетных методов*

Как уже было сказано, соматостатин имеет пять подтипов рецепторов (SSTR1 – SSTR5), которые активно экспрессируются преимущественно в органах центральной нервной системы (спинной мозг, гипоталамус, передняя доля гипофиза), а также желудочно-кишечного тракта (поджелудочная железа, желудок, тонкий кишечник).

Рецепторы располагаются на поверхности клеточной мембраны, поэтому их называют мембранными. Все мембранные рецепторы включают в себя три домена: домен узнавания (1), располагающийся в N-концевой части цепи и отвечающий за связывания гормона; трансмембранный домен (2), состоящий из семи плотно уложенных альфа-спиралей, и третий, цитоплазматический домен (3), отвечающий за передачу сигнала в клетку (Рис.44).

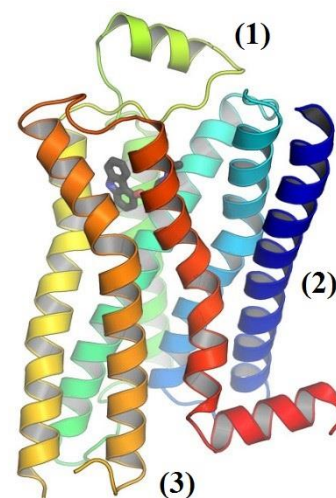


Рис.44. Общая структура рецепторов, сопряженных с G-белками.

Помимо структуры лиганда для моделирования процесса связывания необходима также и структура макромолекулы (рецептора). На сегодняшний день базы данных белковых структур не располагают данными о 3D структуре хотя бы одного из подтипов рецепторов соматостатина, полученных по результатам ЯМР-спектроскопии или другими экспериментальными методами. Поэтому данные структуры могут быть получены только с помощью методов молекулярного моделирования.

#### *Гомологическое моделирование*

Моделирование третичной структуры соматостатиновых рецепторов (SSTR1-SSTR5) осуществлялось с помощью сервиса Phyre2 по имеющимся аминокислотным последовательностям (база данных белковых структур UniProt). Для каждого из пяти рецепторов выбиралась опорная структура (шаблон) при соблюдении высоких значений достоверности (вероятность того, что опорная структура и выбранный рецептор являются гомологами) и процента идентичности (совпадение аминокислотных последовательностей).

Ниже приводятся результаты построения модели для соматостатинового рецептора второго типа (SSTR2), поскольку он является наиболее распространенным по сравнению с остальными типами. Опорной структурой был выбран сигнальный белок, растворимый цитохромный опиоидный рецептор b562 дельта-типа, pdb-идентификатор 4N6H. Достоверность и процент идентичности составили 100 и 39% соответственно. Высокие значения достоверности и процента идентичности позволяют предполагать достаточный уровень правдоподобности полученной модели.

Уточнение полученной структуры, оптимизация геометрии и минимизация энергии проводилось с помощью методов молекулярной динамики. Траектории рассчитывались с длительностью по времени 10-20 нс. Поскольку все рецепторы соматостатина являются мембранными белками, моделирование проводилось в липидном бислое (Рис.45), который помещался в коробку размером 6×6×9 нм. Также добавлялись молекулы воды и хлорид-ионы для достижения электронейтральности системы.

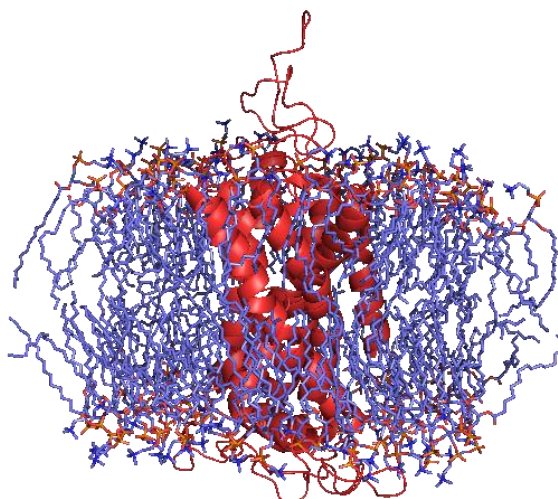


Рис. 45. Моделируемая система, рецептор SSTR2 в липидном бислое.

По результатам рассчитанных траекторий строилась зависимость среднеквадратичного отклонения (RMSD) от времени (Рис.46). Полученная зависимость выходит на плато, колебания на уровне 0,05 нм свидетельствуют о стабильности системы.

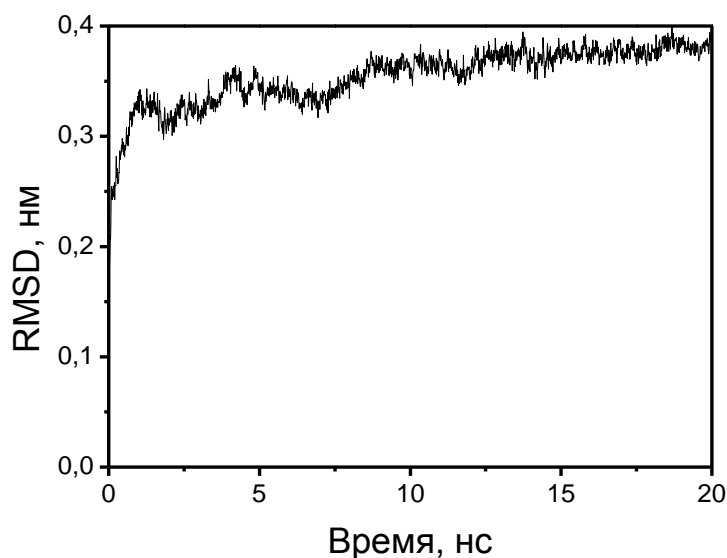


Рис. 46. Зависимость среднеквадратичного отклонения (RMSD) от времени для системы «рецептор в липидном бислое».

При моделировании рецептора в липидном бислое видно, что домен узнавания никак не зафиксирован и при оценке энергии связи с лигандом нужно учитывать его подвижность. Для этого с помощью метода молекулярной динамики был проведен конформационный анализ, и рассчитана траектория длиной 20 нс при  $T = 400$  К. Повышенная температура была выбрана, чтобы преодолеть возможные энергетические барьеры между конформациями. Таким образом, в данном случае метод молекулярной динамики использовался не для симуляции реального процесса, а как алгоритм для

генерации возможных равновесных геометрий. Для полученной траектории была построена зависимость полной энергии системы от времени (Рис.47):

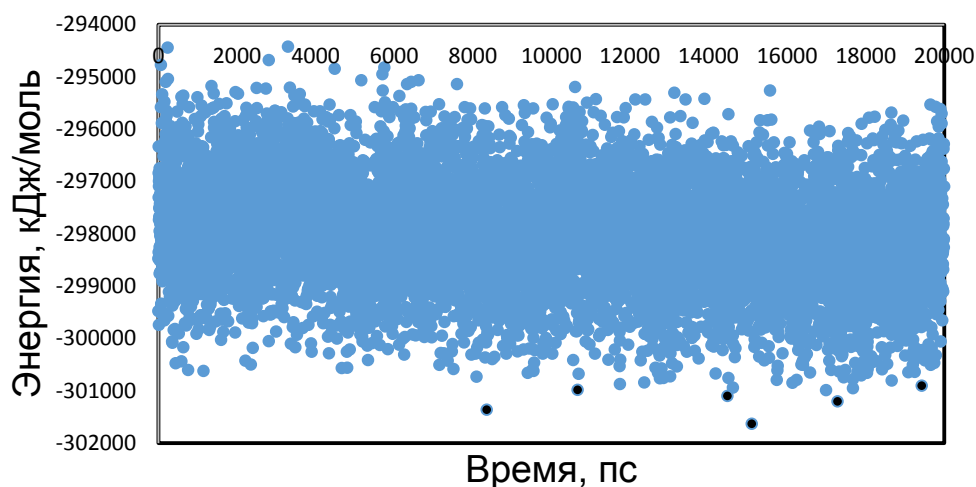


Рис.47. Зависимость полной энергии системы «рецептор в липидном бислое» от времени.

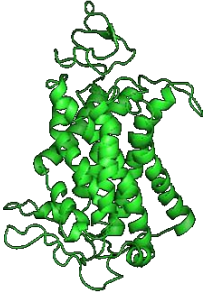
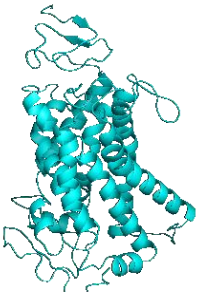
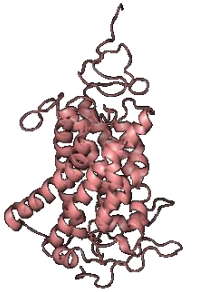
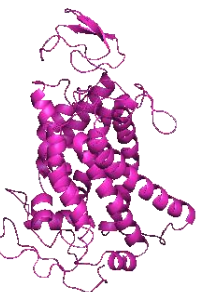

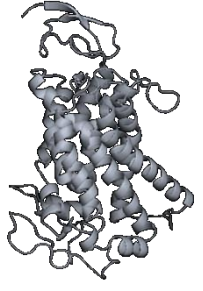
Из полученной зависимости были выбраны несколько точек с наименьшей энергией (выделены черным). Данные для этих точек представлены в таблице 16.

#### *Молекулярный докинг*

Полученные модели третичной структуры (Таблица 15) были использованы для определения сродства исследуемых пептидов к SSTR2. Для этого с помощью программы Autodock был проведен молекулярный докинг рецептора соматостатина второго типа и соматостатиновых аналогов, в качестве области связывания выбиралась область рецептора с аминокислотами Asn276 и Phe294 в центре. По имеющимся литературным данным эти аминокислоты являются ключевыми для процесса связывания лиганда [168]. В первую очередь в роли лиганда был рассмотрен октапептид октреотид, так как известно, что октреотид способен связываться с двумя подтипами соматостатиновых рецепторов – SSTR2 и SSTR5. По результатам полученных моделей стыковки выбиралась модель с наибольшей энергией связи (Рис.48). Для SSTR2 энергии связи рассчитывались отдельно для каждой конформации. Для полученных моделей стыковки с наибольшей энергией связи с помощью программы Rmol определялись водородные связи между лигандом и рецептором и отмечалось, какие аминокислоты рецептора участвуют в их образовании.



Таблица 16. Геометрии рецептора, соответствующие точкам с наименьшей полной энергией системы.

Время, пс	Полная энергия, кДж/моль	Геометрия	Время, пс	Полная энергия, кДж/моль	Геометрия
8360	-301366		15108	-301636	
10678	-300986		17296	-301209	
14492	-301105		19434	-300908	

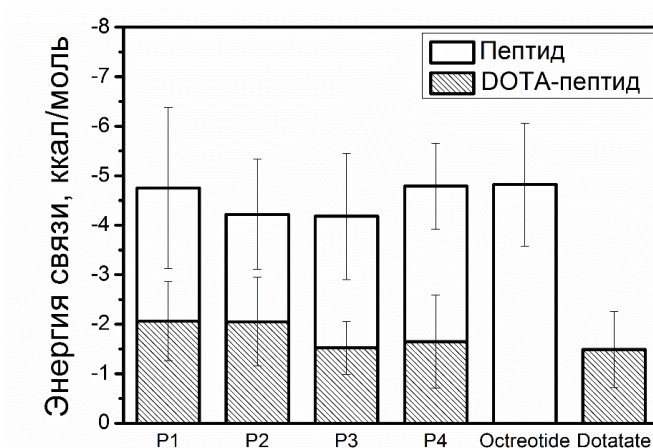


Рис. 48. Энергии связи рецептора соматостатина второго типа с различными лигандами.

Из полученных результатов (Рис.48) 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 с SSTR2 и DOTATATE могут указывать на перспективность DOTA-P в качестве аналогов соматостатина.

Для всех исследуемых пептидов в образовании водородных связей участвуют аминокислоты: Thr287, Pro288, Leu290 и Lys291, которые предположительно могут быть ключевыми в процессе связывания лиганда, помимо Asn276 и Phe294 (Рис.49).

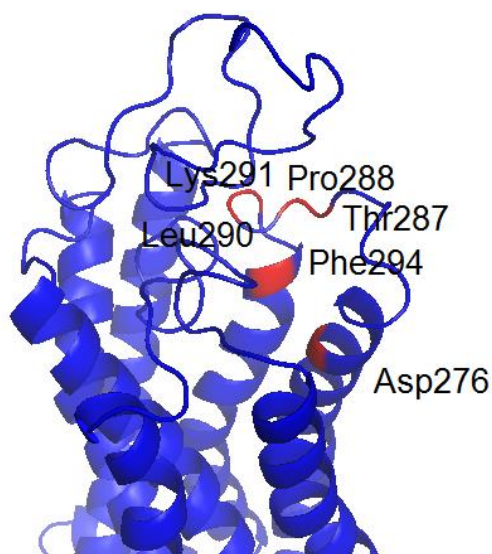


Рис.49. Аминокислоты, участвующие в образовании водородных связей (выделены красным).

### ***5.2. 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-кратного (1000-кратного в случае DOTA-P1) избытка октреотида в зависимости от возрастающих концентраций  $^{152}\text{Eu}$ -DOTA-P при 4°C через 2 часа. Клетки IMR-32 экспрессируют типы рецепторов SSTR2 и SSTR5, при этом октреотид связывается с этими же типами рецепторов. Для конъюгата DOTA-P1 наблюдается разница между скоростью счета клеточной фракции в отсутствие (полное связывание: специфичное + неспецифичное) и в присутствии октреотида (неспецифичное связывание), что может указывать на наличие специфичного связывания (разница между полным и неспецифичным) с рецепторами (Рис.50). Однако для DOTA-P1 не удалось

получить кривую насыщения - зависимость фракции специфично связанного конъюгата от фракции свободного, и соответственно не удалось рассчитать константу диссоциации комплекса «рецептор-лиганд», характеризующую сродство. В среднем неспецифичное связывание составило 38% от общего (максимум 64%).

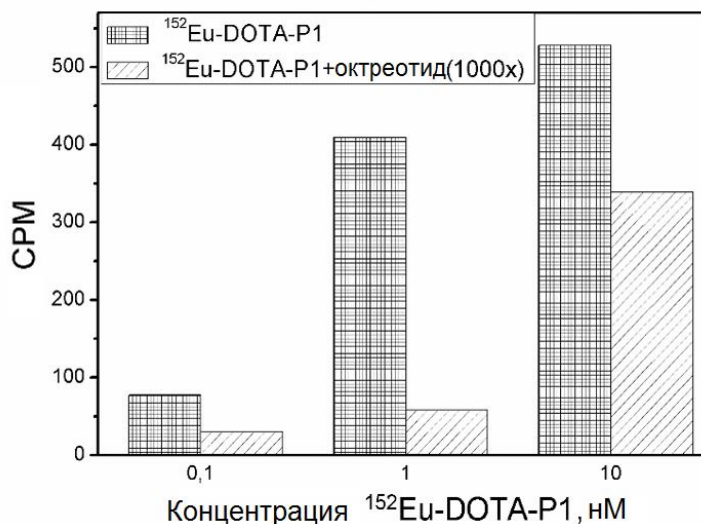


Рис. 50. Связывание [ $^{152}\text{Eu}$ ]Eu-DOTA-P1 с клетками IMR-32 в присутствии и в отсутствии октреотида.

В силу неблагоприятных условий мечения конъюгата DOTA-P2 долгоживущими катионами  $^{152}\text{Eu}$  и  $^{207}\text{Bi}$ , эксперименты по сродству с данным конъюгатом не проводились.

Для конъюгата DOTA-P4 также наблюдается разница между скоростью счета клеточной фракции в отсутствии и в присутствии октреотида (Рис.51) и было показано, что специфичное связывание достигает насыщения при концентрации DOTA-P4 5 нМ (Рис. 52). 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 программе OriginPro, в результате чего была рассчитана кажущаяся константа диссоциации комплекса «рецептор-лиганд»  $K_d$ , которая составила  $1,56 \pm 0,58$  нМ.

Для конъюгата DOTA-P3 результаты были обработаны аналогичным способом, что и для DOTA-P4 (Рис. 53 и 54). Специфичное связывание достигает насыщения при концентрации DOTA-P4 1,3 нМ. Максимальное неспецифичное связывание оказалось 74% от общего и в среднем составило 51%,  $K_d = 0,73 \pm 0,07$  нМ.

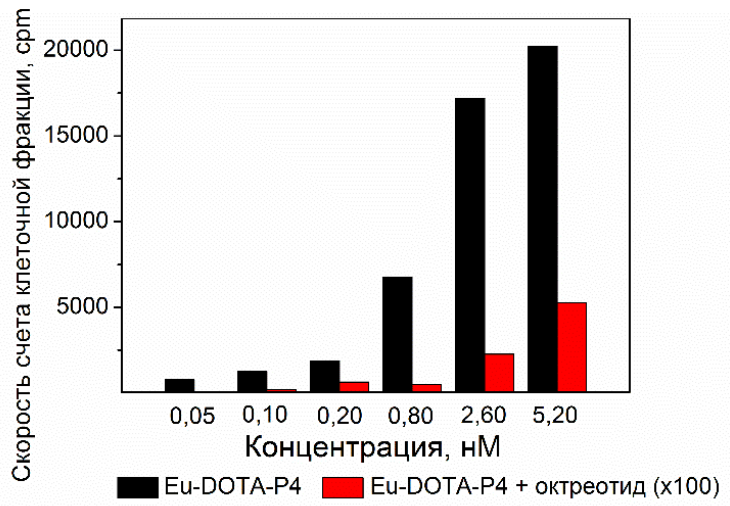


Рис.51. Связывание  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$  с клетками IMR-32 в присутствии и в отсутствии октреотида.

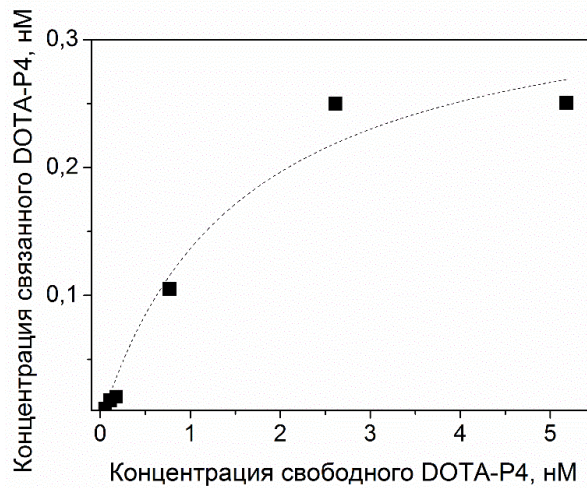


Рис. 52. Кривая насыщения для специфического связывания  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$  с клетками IMR-32.

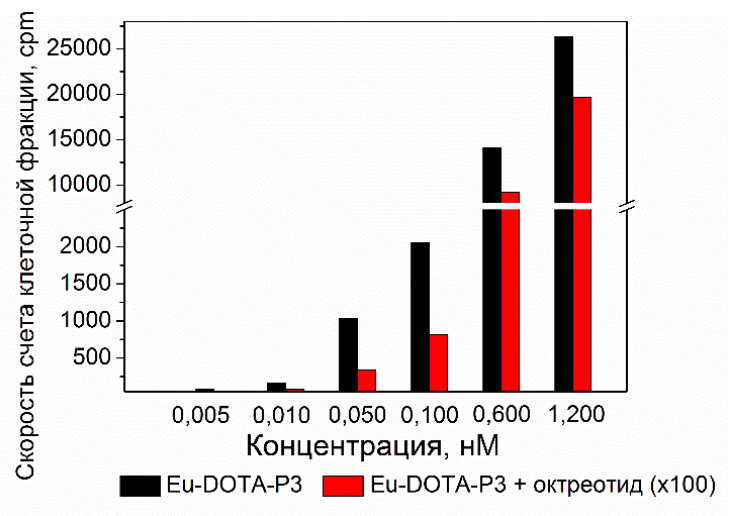


Рис.53. Связывание  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P3}$  с клетками IMR-32 в присутствии и в отсутствии октреотида.

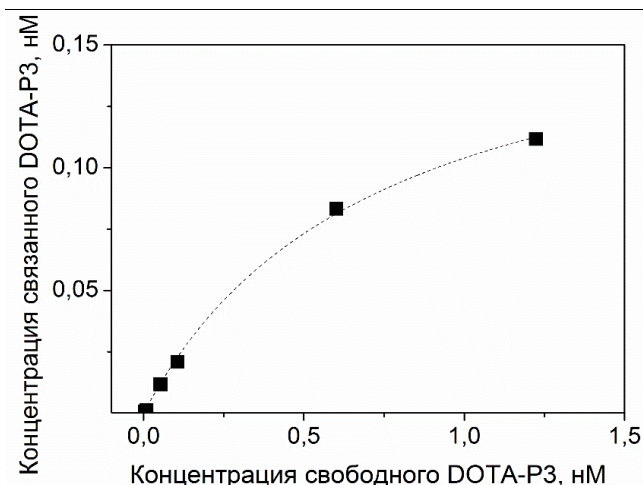


Рис. 54. Кривая насыщения для специфического связывания  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-ДОТА-Р3}$  с клетками IMR-32.

Насколько нам известно, в литературе нет данных об аналогичных ультракоротких тетра- и пентапептидах, изученных на сродство к рецепторам соматостатина. Ранее сохранение биологической активности при переходе к более коротким пептидам с аналогичной тетрапептидной последовательностью постулировалось опосредованно по результатам ингибирования различных метаболических процессов, однако связывание с клетками, экспрессирующими рецепторы соматостатина, напрямую показано не было [169,170]. Более того, было высказано предположение, что, помимо аминокислотной последовательности Phe-D-Trp-Lys-Thr, пептид должен принимать циклическую структуру или включать циклический фрагмент, образующий подходящую конформацию, благодаря которой молекула распознается рецептором.

Для трех исследованных конъюгатов (ДОТА-Р1, ДОТА-Р3, ДОТА-Р4) наблюдается конкуренция с октреотидом, что подтверждает специфичность по отношению к SSTR2 и SSTR5. Однако во всех случаях присутствует неспецифичное связывание, менее всего выраженное для ДОТА-Р4. Построение кривой насыщения для ДОТА-Р4 и ДОТА-Р3 позволило оценить кажущуюся константу диссоциации взаимодействия лиганд-рецептор [171]. Все полученные значения  $K_d$  согласуются со значениями для других меченых конъюгатов соматостатина: Ga-DOTATOC ( $2,5 \pm 0,5$  нМ), In-DTPA-[Tyr3]-октреотат ( $1,3 \pm 0,2$  нМ), Ga-DOTATATE ( $0,2 \pm 0,04$  нМ) и демонстрируют лучшее сродство по сравнению с In-DTPA-октреотид ( $22 \pm 3,6$  нМ) и Y-DOTATOC ( $11 \pm 1,7$  нМ) [18,117]. Использование других катионов в аналогичных экспериментах может повлиять на кажущуюся константу диссоциации как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения, обычно не более чем на 1 порядок.



## Глава 6. Исследование вторичной структуры конъюгатов коротких пептидов

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

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Fedotova 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.

При исследовании вторичной структуры белковых и пептидных молекул методом спектроскопии кругового дихроизма вывод о присутствии в молекуле различных вариантов структур (альфа-спираль, бета-лист, бета-поворот, неупорядоченная структура) делают, основываясь на наличии в форме спектра определенных пиков [172] (Рис.55). Поскольку типы структуры альфа-спираль и бета-лист могут образовывать только белковые молекулы, состоящие из большого числа аминокислот, в нашем случае для коротких пептидов мы можем ожидать либо отсутствие какой-либо упорядоченности, либо наличие бета-поворота, который стабилизируется за счет образования водородных связей между аминокислотами (Рис.56). В литературе можно встретить порядка четырех типов β-поворота, при этом для всех типов характерно наличие одного положительного пика в диапазоне длин волн 195 – 205 нм, и двух отрицательных пиков в диапазонах 180-190 и 220-230 нм [173].

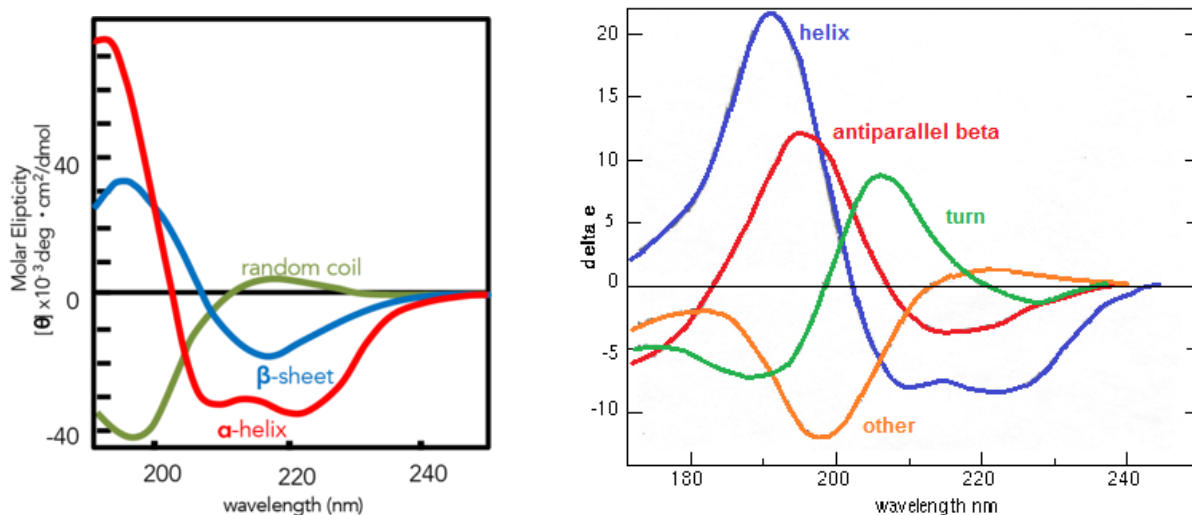


Рис. 55. Идентификация вторичной структуры пептидных и белковых молекул с помощью спектроскопии кругового дихроизма.  $\alpha$ -helix –  $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -sheet –  $\beta$ -лист, turn – поворот (петля), random coil – неупорядоченная структура [172].

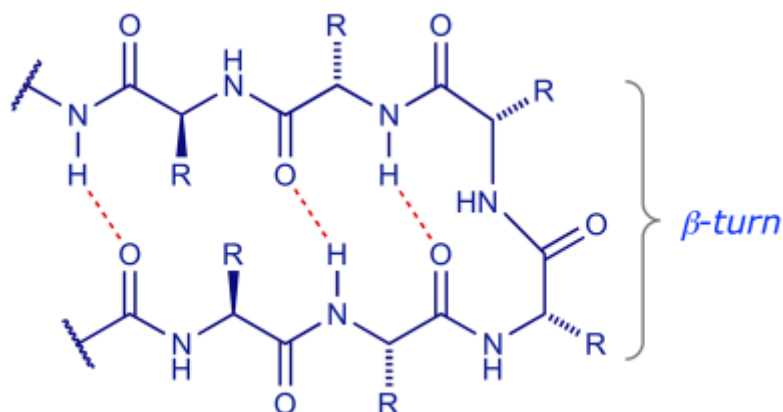
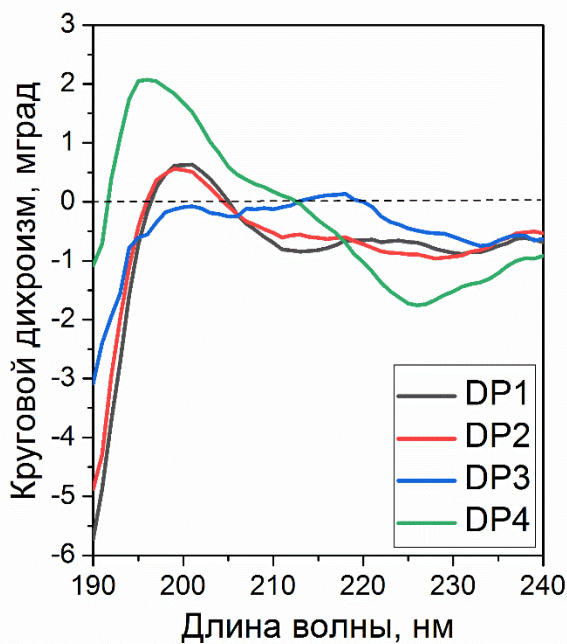


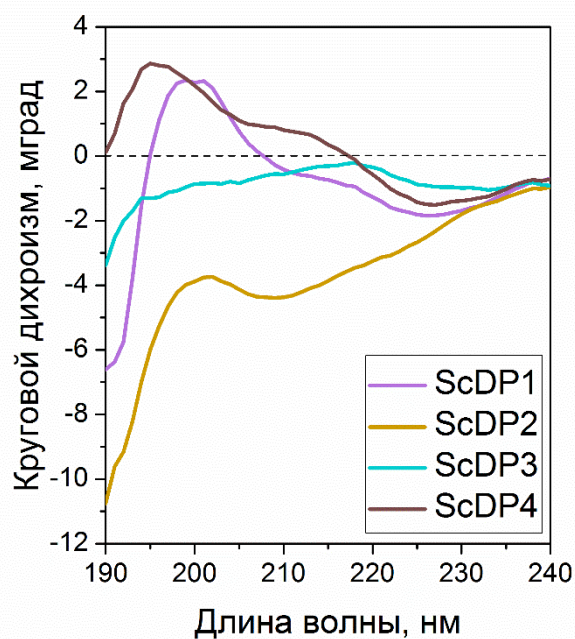
Рис.56. Образование бета-поворота в пептидной молекуле.

Форма полученных спектров кругового дихроизма для конъюгатов DOTA-P (Рис.57а) демонстрирует отсутствие различий в форме спектра между конъюгатами DOTA-P1 и DOTA-P2; иными словами, при добавлении аминокислоты Thz между хелатором и основной тетра-последовательностью вторичная структура конъюгата не изменяется. При этом форма спектра DOTA-P4 имеет большие интенсивности пиков как в области положительных значений мград, так и отрицательных. Наличие отрицательного и положительного пиков при 226 и 205 нм соответственно может указывать на наличие  $\beta$ -поворота в структуре пептидного конъюгата. Отдельно можно отметить, что форма спектра для DOTA-P3 имеет мало общего со всеми остальными конъюгатами, что может свидетельствовать о том, что наличие From-фрагмента не способствует принятию более

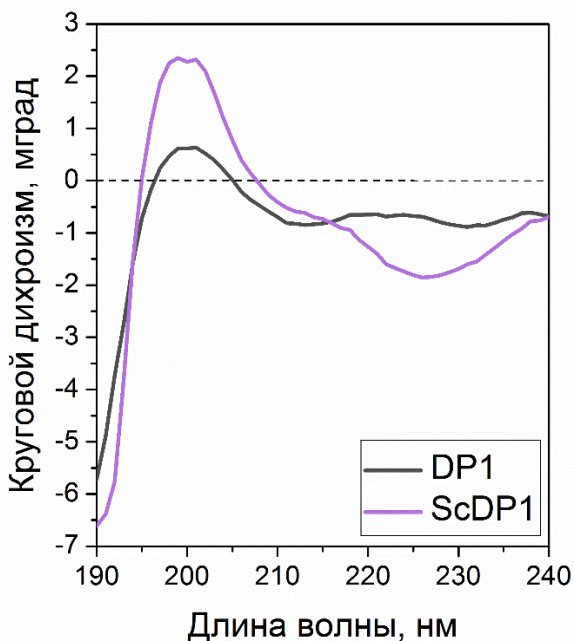
выгодной конформации, а скорее наоборот, негативно влияет на данный фактор, что согласуется с результатами по средству DOTA-P4 и DOTA-P3 к клеткам IMR-32.



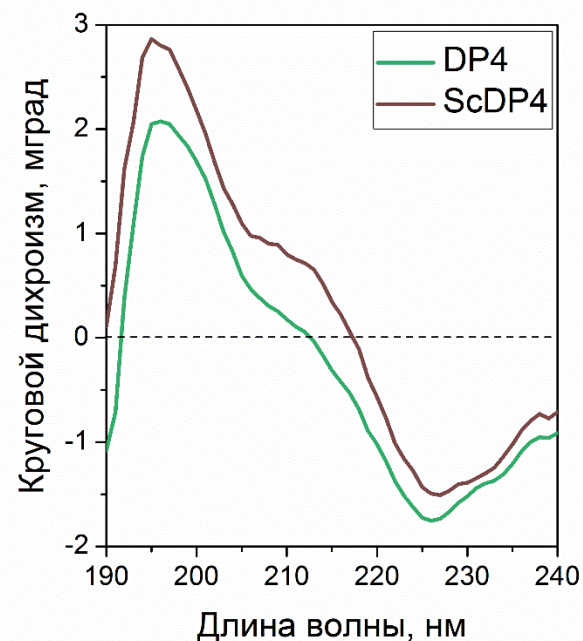
а)



б)



в)



г)

Рис. 57. Спектры кругового дихроизма для свободных конъюгатов и конъюгатов в комплексе со скандием (DP=DOTA-P).

В случае конъюгатов Sc-DOTA-P (Рис.57б) 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 226 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.57г).

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 имеет характер  $\beta$ -поворота, и который, соответственно, отвечает главному структурному требованию, предъявляемому к соматостатиновым аналогам, является DOTA-P4. Этот факт является особенно интересным и неожиданным, поскольку в структуре DOTA-P4 хелатор расположен не с N-, а с C-конца пептидной цепи. Обычно хелатор располагают с N-конца, как наиболее удаленного от активного центра, чтобы снизить влияние хелатора на сродство к рецептору.

## Глава 7. Исследование биораспределения и устойчивости комплексов *in vivo*

Для исследования биораспределения комплексов пептидных конъюгатов на иммунодефицитных мышах использовалась клеточная линия нейробластомы человека IMR-32, экспрессирующая SSTR2 и SSTR5, и 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 анализ устойчивости меченных комплексов в условиях живого организма. Для этого распределение комплекса с пептидом сопоставляется с распределением свободного катиона радионуклида. Другим вариантом может быть метод «блокирования» целевых рецепторов на поверхности опухоли и некоторых других органов путем предварительной инъекции препарата, достоверно связывающегося с нужными рецепторами.

С целью соблюдения принципов гуманного обращения с лабораторными животными, а также 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.

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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. [<sup>161</sup>Tb]Tb-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA: a potential radiopharmaceutical for the treatment of neuroendocrine tumors // *Mendelev Communications*. 2023. Vol. 33. No. 4. P.469-471.

Животные были разделены на группы в зависимости от вводимого вещества: 1) исследуемый комплекс [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTA-P4, 2) [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTATATE – вещество, выступающее в качестве положительного контроля, поскольку комплексы DOTATATE с радионуклидами РЗЭ устойчивы в условиях *in vivo* и накапливаются в опухоли, на поверхности которой присутствуют рецепторы SSTR2 и SSTR5 [174,175], 3) [<sup>152</sup>Eu]EuCl<sub>3</sub> – раствор свободного катиона (отрицательный контроль). Полученные данные о распределении всех вводимых веществ представлены в Таблице 17.

Таблица 17. Распределение меченных соединений  $^{152}\text{Eu}$  через 6 ч после введения. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение,  $n=4$ .

	% введенной дозы на грамм		
	$[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$	$[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТАТАТЕ}$	$[^{152}\text{Eu}]\text{EuCl}_3$
опухоль	0,234 $\pm$ 0,197	0,367 $\pm$ 0,302	0,082 $\pm$ 0,115
сердце	0,060 $\pm$ 0,011	0,046 $\pm$ 0,003	0,135 $\pm$ 0,104
легкие	0,122 $\pm$ 0,057	0,093 $\pm$ 0,032	1,211 $\pm$ 0,835
печень	0,271 $\pm$ 0,108	0,210 $\pm$ 0,056	2,476 $\pm$ 2,146
почки	9,724 $\pm$ 3,910	6,467 $\pm$ 1,931	0,101 $\pm$ 0,126
бедренная кость	0,399 $\pm$ 0,121	0,109 $\pm$ 0,011	0,282 $\pm$ 0,205
селезенка	0,119 $\pm$ 0,044	0,129 $\pm$ 0,029	1,827 $\pm$ 1,942
поджелудочная железа	0,053 $\pm$ 0,009	0,138 $\pm$ 0,022	0,180 $\pm$ 0,119
мозг	0,019 $\pm$ 0,011	0,026 $\pm$ 0,006	0,075 $\pm$ 0,064
кровь	0,246 $\pm$ 0,281	0,049 $\pm$ 0,022	0,515 $\pm$ 0,552
тело	1,107 $\pm$ 0,881	0,153 $\pm$ 0,089	0,139 $\pm$ 0,092
опухоль/кровь	1,757 $\pm$ 2,130	6,759 $\pm$ 2,677	0,310 $\pm$ 0,189
опухоль/печень	0,743 $\pm$ 0,417	1,644 $\pm$ 0,987	0,294 $\pm$ 0,518
опухоль/почки	0,021 $\pm$ 0,013	0,053 $\pm$ 0,030	1,897 $\pm$ 1,23

Из полученных данных видно, что катионы европия, не связанные изначально в комплекс, преимущественно накапливаются в легких, печени и селезенке, что согласуется с литературными данными по распределению катионов РЗЭ в условиях *in vivo* [176–178]. В то же время для исследуемого комплекса  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$  наибольшее накопление регистрируется в почках, как и для  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТАТАТЕ}$ . Комплексы  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТАТАТЕ}$  и  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$  подвергаются почечному клиренсу, что подтверждается результатами измерения собранной мочи. Для  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$

наибольшая скорость счета наблюдается в моче уже через 1 ч (Рис.58). При этом результаты анализа собранной мочи в группе 1 с помощью ВЭЖХ (Рис.59) и группе 2 с помощью ТСХ (Рис. 60) демонстрируют наличие в ней только исходных комплексов, что в совокупности подтверждает устойчивость комплексов  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТАТATE}$  и  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$  в условиях *in vivo*.

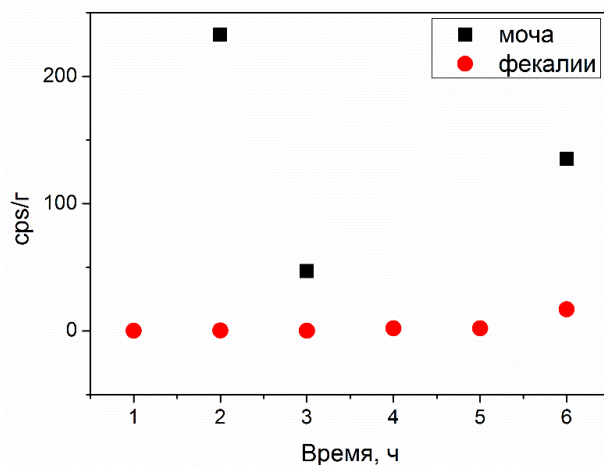


Рис.58. Скорость счета собранных продуктов выделения от времени в группе, которой вводился  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$ .

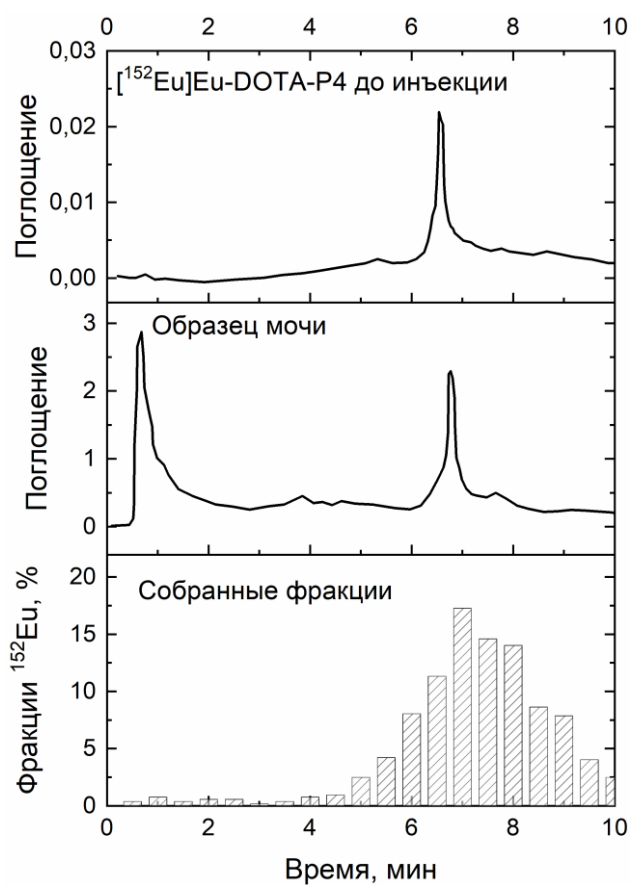


Рис. 59. Хроматограммы ВЭЖХ для комплекса  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$  до инъекции, соответствующего образца мочи и результаты измерения радиоактивности собранных фракций для образца мочи.

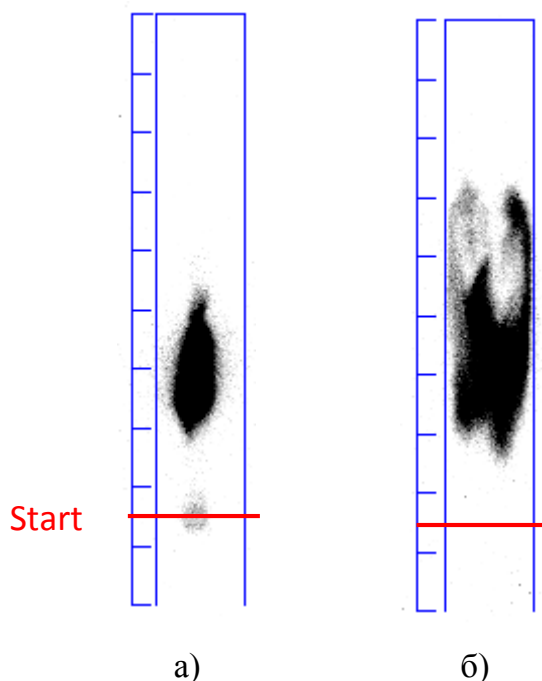


Рис. 60. Результаты автордиографии пластин ТСХ для образца  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-}$ DOTATATE до инъекции (а) и соответствующий образец мочи мыши (б) в системе  $\text{SiO}_2\text{-Al/C}_5\text{H}_5\text{N:EtOH:H}_2\text{O}=1:2:4$  (V:V),  $R_f = 0,3$ .

Интересно, что накопление  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-}$ DOTA-P4 в почках превышает аналогичное накопление  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-}$ DOTATATE, что может быть связано с меньшей длиной аминокислотной цепи исследуемого пептида и его большей гидрофильностью. Также стоит отметить, что накопление препарата в почках связано с наличием в них тех же рецепторов соматостатина [179,180]. Наблюдаемое накопление  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-}$ DOTA-P4 в опухоли превышает этот же параметр для свободного катиона почти в 3 раза, но в то же время оно в 1,5 раза меньше, чем в случае  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-}$ DOTATATE. В целом, преимущественное накопление  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-}$ DOTATATE в почках, а не в опухоли может свидетельствовать о большем количестве рецепторов SST в почках (могут присутствовать и другие типы) и о низкой плотности SSTR2,5 в клетках IMR-32.

Поскольку, помимо опухоли, для некоторых органов также характерна экспрессия SSTR (в первую очередь это почки, надпочечники, поджелудочная железа, гипофиз, желудочно-кишечный тракт и легкие), было решено дополнительно провести эксперимент в условиях «заблокированных» рецепторов путем совместного введения исследуемого комплекса и 10-кратного избытка октреотида. По результатам эксперимента с «заблокированными» рецепторами, накопление  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-}$ DOTA-P4 в части интересующих органов существенно снижается по сравнению с животными,

которым предварительно не вводился октреотид (Таблица 18, выделены жирным), что может подтверждать сохранение специфичности [<sup>152</sup>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.

Таблица 18. Распределение [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTA-P4 в организме мышей через 6 ч после введения в присутствии и в отсутствии избытка «блокирующего» вещества (октреотид). Данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение, n=4.

	ID/г, %	ID/г, % + октреотид
<b>Опухоль</b>	0,233±0,197	0,024±0,002
Сердце	0,060±0,011	0,036±0,001
<b>Легкие</b>	0,122±0,057	0,041±0,009
Печень	0,271±0,108	0,172±0,012
<b>Почки</b>	9,724±3,91	5,105±0,899
<b>Надпочечники</b>	0,150±0,051	0,011±0,023
Селезенка	0,119±0,044	0,134±0,011
<b>Поджелудочная железа</b>	0,053±0,009	0,016±0,009
<b>Желудочно-кишечный тракт</b>	0,553±0,440	0,145±0,095
Мозг	0,019±0,011	0,014±0,005
Кровь	0,246±0,281	0,217±0,096

Таким образом, учитывая, что биораспределение исследуемого комплекса [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTA-P4 по своим численным значениям ближе к распределению [<sup>152</sup>Eu]Eu-DOTATATE, чем [<sup>152</sup>Eu]EuCl<sub>3</sub>; а также результаты ВЭЖХ мочи, можно говорить об устойчивости комплекса в условиях *in vivo*, при этом результаты распределения препарата в условиях «заблокированных» рецепторов не позволяют до конца утверждать о сохранении аффинности к рецепторам SSTR.

## Глава 8. Сравнение комплексов $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$ и $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOТА-P4}$

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  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$ , было решено сравнить с комплексом DOТА-P4 с катионом тербия.

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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.

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.  $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOТА}$ : a potential radiopharmaceutical for the treatment of neuroendocrine tumors // Mendeleev Communications. 2023. Vol. 33. No. 4. P.469-471.

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 19). Именно выраженное сходство всех лантаноидов друг с другом, а особенно каждого со своими соседями, ставшее следствием общего принятия степени окисления +3 в водных растворах, делает их свойства очень похожими [181].

Таблица 19. Сравнительные характеристики лантаноидов: Eu, Gd, Tb.

$\text{M}^{3+}$	$R_i$ (CN 8), Å [156]	$\lg \beta_{\text{M-он}}$ [157]	$\lg \beta_{\text{M-DOТА}}$
$\text{Eu}^{3+}$	1,07	-7,90	26,2; 28,2 [61,62]
$\text{Gd}^{3+}$	1,05	-7,93	25,8 [182]
$\text{Tb}^{3+}$	1,04	-7,86	28,6 [62]

Как было сказано выше, тербий имеет 4 изотопа с массовыми числами 149, 152, 155 и 161, представляющих интерес для ядерной медицины. В данной работе был выбран радионуклид тербий-161 и для получения было решено исследовать возможности

альтернативного пути получения с использованием ускорителя электронов, так как данный способ всё больше рассматривается при получении медицинских радионуклидов. 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.

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

Подбор условий для анализа комплекса  $[\text{}^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOТА-P4}$  методом ТСХ подтвердил пригодность систем « $\text{SiO}_2\text{-0,1M Na}_3\text{Cit}$ , pH 5» и «целлюлоза-0,01 M EDTA, pH 6», использовавшихся при анализе комплексов с DOTA-P4, в частности  $[\text{}^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$ . Распределение форм свободного  $^{161}\text{Tb}^{3+}$  и комплекса  $[\text{}^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOТА-P4}$  в данных системах протекает аналогично распределению свободного  $^{152}\text{Eu}^{3+}$  и  $[\text{}^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$ . Для анализа была выбрана система «целлюлоза-0,01 M EDTA, pH 6», поскольку для нее характерно более быстрое движение элюента по неподвижной фазе. Результаты мечения DOTA-P4 катионами  $^{161}\text{Tb}$  демонстрируют высокую радиохимическую чистоту уже через 5 минут после начала реакции, что даже превышает скорость реакции мечения в сравнении с катионами европия (Рис. 61), что может быть связано с более высоким значением константы устойчивости комплекса Tb-DOТА по сравнению с Eu-DOТА:

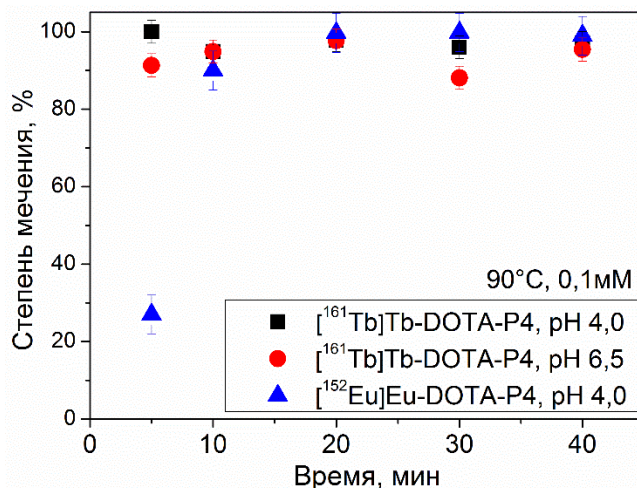


Рис. 61. Зависимость степени мечения DOTA-P4 катионами  $^{161}\text{Tb}$  и  $^{152}\text{Eu}$  от времени.

Полученный комплекс со степенью мечения 95-98% был исследован на стабильность в избытке сывороточных белков. В течение 24 ч стабильность комплекса



остаётся на уровне 90% (Рис.62), что коррелирует со значениями, полученными для европиевого комплекса.

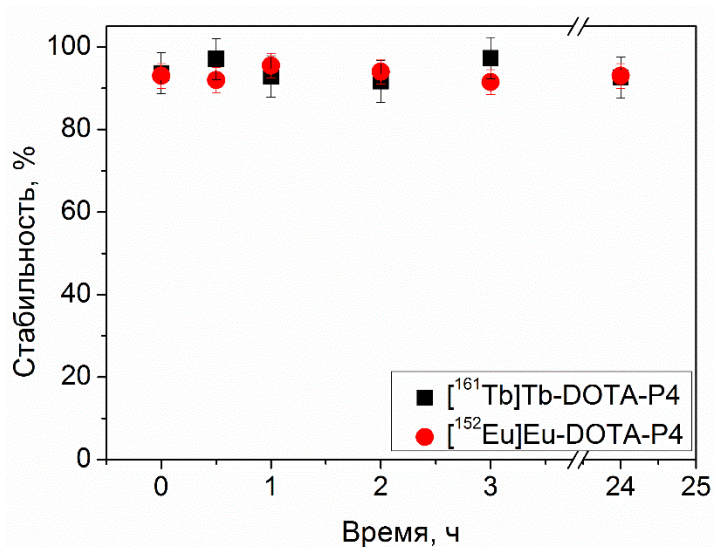


Рис. 62. Устойчивость комплекса [<sup>161</sup>Tb]Tb-DOТА-P4 в сыворотке.

Таким образом, в данной работе потенциальный медицинский радионуклид <sup>161</sup>Tb был получен с помощью фотоядерного облучения мишени из оксида диспрозия природного состава. При мечении конъюгата DOТА-P4 катионами <sup>161</sup>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 Vi-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.  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P3}$  и  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$  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  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$  демонстрирует существенно меньшее неспецифическое 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  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$  демонстрирует устойчивость в условиях *in vivo* на мышцах 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.

## Список литературы

1. Brazeau P. et al. Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone // *Science*. 1973. Vol. 179, № 4068. P. 77–79.
2. Patel Y.C. et al. The somatostatin receptor family // *Life Sci*. 1995. Vol. 57, № 13. P. 1249–1265.
3. Patel Y.C. Somatostatin and its receptor family // *Front. Neuroendocrinol*. 1999. Vol. 20, № 3. P. 157–198.
4. Weckbecker G. et al. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects // *Nat. Reviews*. 2003. Vol. 2. P. 999–1017.
5. Pyronnet S. et al. Antitumor effects of somatostatin // *Mol. Cell. Endocrinol*. 2008. Vol. 286. P. 230–237.
6. Günther T. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature // *Pharmacol. Reviews*. 2018. Vol. 70. P. 763–835.
7. Rai U. et al. Pharmacology & Therapeutics Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications // *Pharmacol. Ther. Elsevier Inc.*, 2015. Vol. 152. P. 98–110.
8. Reubi J.C. et al. Somatostatin Receptors and Their Subtypes in Human Tumors and in Peritumoral Vessels // *Metabolism*. 1996. Vol. 45, № 8. P. 39–41.
9. Reubi J.C. et al. Original article Somatostatin receptor sst1 – sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands // *Eur. J. Nucl. Med*. 2001. Vol. 28, № 7. P. 836–846.
10. Gomes-Porras M., Cardenas-Salas J., Álvarez-Escola C. Somatostatin Analogs in Clinical Practice: A Review // *Int. J. Mol. Sci*. 2020. Vol. 21. P. 1682–1708.
11. Rinke A. et al. Placebo-Controlled, Double-Blind, Prospective, Randomized Study on the Effect of Octreotide LAR in the Control of Tumor Growth in Patients With Metastatic Neuroendocrine Midgut Tumors: A Report From the PROMID Study Group // *J. Clin. Oncol*. 2009. Vol. 27, № 28. P. 4656–4663.
12. Caplin M.E. et al. Anti-tumour effects of lanreotide for pancreatic and intestinal neuroendocrine tumours : the CLARINET open-label extension study // *Endocr. Relat. Cancer*. 2016. Vol. 23, № 3. P. 191–199.
13. Reubi J.C. Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer // *Endocr. Reviews*. 2003. Vol. 24, № 4. P. 389–427.
14. Sheppard M. et al. Metabolic Clearance and Plasma Half-Disappearance // *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab. 2015. Vol. 48, № 1. P. 50–53.
15. Anthony L., Freda P.U. From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue Review From somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue // *Curr. Med. Res. Opin.* 2009. Vol. 25, № 12. P. 2989–2999.
  16. Oberg K., Lamberts S.W.J. Somatostatin analogues in acromegaly and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: past, present and future // *Endocr. Relat. Cancer.* 2016. Vol. 23. P. R551–R556.
  17. Ryan P. et al. Lanreotide vs octreotide LAR for patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: An observational time and motion analysis // *J. Oncol. Pharm. Pract.* 2019. Vol. 25, № 6. P. 1425–1433.
  18. 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, № 3. P. 273–282.
  19. Veber D.F. et al. A potent cyclic hexapeptide analogue of somatostatin // *Nature.* 1981. Vol. 292, № 5818. P. 55–58.
  20. Weckbecker G. et al. SOM230: A New Somatostatin Peptidomimetic with Potent Inhibitory Effects on the Growth Hormone/ Insulin-Like Growth Factor-I Axis in Rats, Primates, // *Endocrinology.* 2002. Vol. 143, № 10. P. 4123–4130.
  21. Feelders R.A., Yasothan U., Kirkpatrick P. Pasireotide // *Nat. Reviews.* 2012. Vol. 11. P. 597–598.
  22. Raynor K. et al. Characterization of Cloned Somatostatin Receptors and // *Mol. Pharmacol.* 1993. Vol. 44. P. 385–392.
  23. Reubi J.C. et al. A new peptidic somatostatin agonist with high affinity to all five somatostatin receptors // *Eur. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 456. P. 45–49.
  24. Rivier J.E. et al. Potent Somatostatin Undecapeptide Agonists Selective for Somatostatin Receptor 1 (sst1) // *J. Med. Chem.* 2001. Vol. 44, № 13. P. 2238–2246.
  25. Gademann K. et al. Peptide Folding Induces High and Selective Affinity of a Linear and Small -Peptide to the Human Somatostatin Receptor 4 // *J. Med. Chem.* 2001. Vol. 44. P. 2460–2468.
  26. Nunn C. et al.  $\beta 2\beta 3$ -di- and  $\alpha/\beta 3$  -tetrapeptide derivatives as potent agonists at somatostatin sst4 receptors // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2003. Vol. 367. P. 95–103.
  27. Seebach D. et al. Design and Synthesis of  $\gamma$ -Dipeptide Derivatives with Submicromolar Affinities for Human Somatostatin Receptors // *Angew. Chemie.* 2003. Vol. 42, № 7. P. 776–778.

28. Feniuk W. et al. Selective somatostatin sst 2 receptor blockade with the novel cyclic octapeptide, CYN-154806 // *Neuropharmacology*. 2000. Vol. 39. P. 1443–1450.
29. Reubi J.C. et al. SST3-selective potent peptidic somatostatin receptor antagonists // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 97, № 25. P. 13973–13978.
30. Shimon I. et al. Somatostatin Receptor Subtype Specificity in Human Fetal Pituitary Cultures // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 99, № 4. P. 789–798.
31. Crider A.M. Recent Advances in the Development of Nonpeptide Somatostatin Receptor Ligands // *Mini Reviews Med. Chem.* 2002. Vol. 2, № 5. P. 507–517.
32. Lihu Yang. Non peptide Somatostatin Receptor Ligands // *Annu. Rep. Med. Chem.* 1999. Vol. 34. P. 209–218.
33. Rohrer S.P. et al. Rapid Identification of Subtype-Selective Agonists of the Somatostatin Receptor Through Combinatorial Chemistry // *Science*. 1998. Vol. 282, № October. P. 737–741.
34. Rohrer S.P., Schaeffer J.M. Identification and characterization of subtype selective somatostatin receptor agonists // *J. Physiol.* 2000. Vol. 94. P. 211–215.
35. Pasternak A. et al. Potent, orally bioavailable somatostatin agonists: good absorption achieved by urea backbone cyclization // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 1999. Vol. 9, № 3. P. 491–496.
36. Hirschmann R. et al. Nonpeptidal peptidomimetics with beta-D-glucose scaffolding. A partial somatostatin agonist bearing a close structural relationship to a potent, selective substance P antagonist // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. Vol. 114. P. 9217–9218.
37. Hirschmann R. et al. Modulation of receptor and receptor subtype affinities using diastereomeric and enantiomeric monosaccharide scaffolds as a means to structural and biological diversity. A new route to ether synthesis // *J. Med. Chem.* 1998. Vol. 41, № 9. P. 1382–1391.
38. Prasad V. et al. Effects of heterocyclic aromatic substituents on binding affinities at two distinct sites of somatostatin receptors. Correlation with the electrostatic potential of the substituents // *J. Med. Chem.* 2003. Vol. 46, № 10. P. 1858–1869.
39. Ankersen M. et al. Discovery of a novel non-peptide somatostatin agonist with SST4 selectivity // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120, № 7. P. 1368–1373.
40. Souers A.J. et al. Optimization of a somatostatin mimetic via constrained amino acid and backbone incorporation // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2000. Vol. 10, № 24. P. 2731–2733.
41. Hoyer D. et al. SRA880, in vitro characterization of the first non-peptide somatostatin sst1 receptor antagonist // *Neurosci. Lett.* 2004. Vol. 361, № 1–3. P. 132–135.

42. Poitout L. et al. Identification of potent non-peptide somatostatin antagonists with sst3 selectivity // *J. Med. Chem.* 2001. Vol. 44, № 18. P. 2990–3000.
43. Смирнова Л.И., Устинкина С.В., Смирнова А.П. Средство, обладающее противоопухолевым действием. Патент РФ RU2254139. 2005.
44. Balaev et al. Preparation H-Phe-D-Trp- Lys( $\epsilon$ -BOC)-Thr-OMe - tetrapeptide intermediate for somatostatin analogs synthesis // *Russ. Biother. J.* 2011. Vol. 4. P. 43-45.
45. Balaev A.N. et al. Pentapeptide analogs of somatostatin containing a thiazolidine fragment: synthesis and cytotoxic activity // *Russ. Chem. Bull.* 2016. Vol. 65, № 12. P. 2948–2951.
46. Trabocchi A., Guarna A. Cyclic  $\alpha$ -amino acids as prolinemimetics // *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry: The Art of Transforming Peptides in Drugs.* 2014. P. 165–190.
47. Pattaroni C. et al. Cyclic hexapeptides related to somatostatin. Synthesis and biological testing // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990. Vol. 36, № 5. P. 401–417.
48. Tancredi T. et al. Cyclic hexapeptides related to somatostatin Conformational analysis employing  $^1\text{H-NMR}$  and molecular dynamics // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990. Vol. 36, № 5. P. 418–432.
49. Balaev A.N. et al. Synthesis and cytotoxic activity of Boc-protected pentapeptide amide analogs of somatostatin // *Russ. Chem. Bull.* 2016. Vol. 65, № 11. P. 2766–2769.
50. Ike Y. et al. Antitumor agents containing tripeptides or dipeptides. - Patent JP 09040577. - A19970210. 1997.
51. Seko T. et al. Structure-activity study of L-amino acid-based N-type calcium channel blockers // *Bioorganic Med. Chem.* 2003. Vol. 11, № 8. P. 1901–1913.
52. Samanen J. et al. An Investigation of Angiotensin II Agonist and Antagonist Analogues with 5, 5-Dimethylthiazolidine-4-carboxylic Acid and Other Constrained Amino Acids // *J. Med. Chem.* 1991. Vol. 34, № 10. P. 3036–3043.
53. Cao S.L. et al. Synthesis and in vitro antitumor activity of 4(3H)-quinazolinone derivatives with dithiocarbamate side chains // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2005. Vol. 15, № 7. P. 1915–1917.
54. Roščić M. et al. Tumor-Cell-Targeted Methionine-enkephalin Analogues Containing Unnatural Amino Acids: Design, Synthesis, and in Vitro Antitumor Activity // *J. Med. Chem.* 2006. Vol. 49, № 11. P. 3136–3142.
55. Балаев А.Н. et al. Синтез и изучение цитотоксической активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина // *Российский Биотерапевтический Журнал.* 2012. Vol. 4, № 11. P. 47–53.

56. Борисова Л.М. et al. Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение II) // Российский Биотерапевтический Журнал. 2017. Vol. 16. P. 23–29.
57. Price E.W., Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals // Chem. Soc. Rev. 2014. Vol. 43, № 1. P. 260–290.
58. Chaves S., Delgado R., Da Silva J.J.R.F. The stability of the metal complexes of cyclic tetra-aza tetra-acetic acids // Talanta. 1992. Vol. 39, № 3. P. 249–254.
59. Clarke E.T., Martell A.E. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles // Inorganica Chim. Acta. 1991. Vol. 190, № 1. P. 37–46.
60. Majkowska-Pilip A., Bilewicz A. Macrocyclic complexes of scandium radionuclides as precursors for diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals // J. Inorg. Biochem. Elsevier Inc., 2011. Vol. 105, № 2. P. 313–320.
61. 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.
62. 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.
63. Broan C.J. et al. Structure and Solution Stability of Indium and Gallium Complexes of 1,4,7-Triazacyclononanetriacetate and of Yttrium Complexes of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecanetetraacetate and Related Ligands: Kinetically Stable Complexes for Use in Imaging and Radio // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1991. Vol. 2. P. 87–99.
64. Csajbok E. et al. Equilibrium <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy, and X-ray Diffraction Studies on the Complexes Bi(DOTA)- and Bi(DO3A-Bu). 2003. Vol. 42, № 7. P. 2342–2349.
65. Kannengießer S. Optimization of the Synthesis of Ac-225-labelled DOTA-Radioimmunoconjugates for Targeted Alpha Therapy, based on Investigations on the Complexation of Trivalent Actinides by DOTA. 2013. 234 p.
66. Kovács A. Theoretical Study of Actinide(III)-DOTA Complexes // ACS Omega. 2021. Vol. 6, № 20. P. 13321–13330.
67. Wadas T.J. et al. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease // Chem. Rev. 2010. Vol. 110, № 5. P. 2858–2902.
68. Liu S., Edwards S.D. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide

- radiopharmaceuticals // *Bioconjug. Chem.* 2001. Vol. 12, № 1. P. 7–34.
69. Chappell L.L. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of a novel bifunctional chelating agent for the lead isotopes  $^{203}\text{Pb}$  and  $^{212}\text{Pb}$  // *Nucl. Med. Biol.* 2000. Vol. 27, № 1. P. 93–100.
  70. Song H.A. et al. Efficient bifunctional decadentate ligand 3p-C-DEPA for targeted  $\alpha$ -radioimmunotherapy applications // *Bioconjug. Chem.* 2011. Vol. 22, № 6. P. 1128–1135.
  71. Blom E., Koziorowski J. Radiolabelled somatostatin analogues for use in molecular imaging // *Somatostatin: Synthesis, Mechanisms-of-Action and Physiological Effects*. 2013. № March 2013. 41–78 p.
  72. Wild D. et al. DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2003. Vol. 30, № 10. P. 1338–1347.
  73. Bakker W.H. et al. [ $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe1]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis, radiolabeling and in vitro validation // *Life Sci.* 1991. Vol. 49, № 22. P. 1583–1591.
  74. Camera L. et al. Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies // *J. Nucl. Med.* 1994. Vol. 35, № 5. P. 882–889.
  75. Wu C. et al. Stereochemical influence on the stability of radio-metal complexes in vivo. Synthesis and evaluation of the four stereoisomers of 2-(p- nitrobenzyl)-trans-CyDTPA // *Bioorganic Med. Chem.* 1997. Vol. 5, № 10. P. 1925–1934.
  76. Lamberts S.W.J. et al. Somatostatin-receptor imaging in the localization of endocrine tumors // *New English J. Med.* 1990. Vol. 323, № 18. P. 1246–1249.
  77. Bakker W.H. et al. In vivo use of a radioiodinated somatostatin analogue: Dynamics, metabolism, and binding to somatostatin receptor-positive tumors in man // *J. Nucl. Med.* 1991. Vol. 32, № 6. P. 1184–1189.
  78. Bakker W.H. et al. Receptor scintigraphy with a radioiodinated somatostatin analogue: Radiolabeling, purification, biologic activity, and in vivo application in animals // *J. Nucl. Med.* 1990. Vol. 31, № 9. P. 1501–1509.
  79. Bakker W.H. et al. In vivo application of [ $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe1]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats // *Life Sci.* 1991. Vol. 49, № 22. P. 1593–1601.
  80. Krenning E.P. et al. Somatostatin Receptor Scintigraphy with Indium-111-DTPA-D-Phe-1-Octreotide in Man: Metabolism, Dosimetry and Comparison with Iodine-123-Tyr-3-Octreotide // *J. Nucl. Med.* 1992. Vol. 33, № 5. P. 652–658.



81. Cremonesi M. et al. Correlation of dose with toxicity and tumour response to <sup>90</sup>Y- and <sup>177</sup>Lu-PRRT provides the basis for optimization through individualized treatment planning // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2018. Vol. 45, № 13. P. 2426–2441.
82. Otte A. et al. DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy // *Eur. J. Nucl. Med.* 1997. Vol. 24, № 7. P. 792–795.
83. Otte A. et al. Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment // *Lancet*. 1998. Vol. 351, № 9100. P. 417–418.
84. Otte A. et al. Yttrium-90 DOTATOC: First clinical results // *Eur. J. Nucl. Med.* 1999. Vol. 26, № 11. P. 1439–1447.
85. Forrer F. et al. A comparison of <sup>111</sup>In-DOTATOC and <sup>111</sup>In-DOTATATE: Biodistribution and dosimetry in the same patients with neuroendocrine tumours // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2004. Vol. 31, № 9. P. 1257–1262.
86. Vinjamuri S. et al. Peptide receptor radionuclide therapy with Y-DOTATATE / <sup>90</sup>Y-DOTATOC in patients with progressive metastatic neuroendocrine tumours : assessment of response , survival and toxicity // *Br. J. Cancer. Nature Publishing Group*, 2013. Vol. 108. P. 1440–1448.
87. Virgolini I. et al. <sup>111</sup>In- and <sup>90</sup>Y-DOTA-lanreotide: Results and implications of the MAURITIUS trial // *Semin. Nucl. Med.* 2002. Vol. 32, № 2. P. 148–155.
88. Bodei L. et al. Yttrium-labelled peptides for therapy of NET // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2012. Vol. 39. P. S93–S102.
89. Gabriel M. et al. Twelve-year follow-up after peptide receptor radionuclide therapy // *J. Nucl. Med.* 2019. Vol. 60, № 4. P. 524–529.
90. Baum R.P. et al. [<sup>177</sup>Lu-DOTA]0-D-Phe1-Tyr3-Octreotide (<sup>177</sup>Lu-DOTATOC) for peptide receptor radiotherapy in patients with advanced neuroendocrine tumours: A Phase-II study // *Theranostics*. 2016. Vol. 6, № 4. P. 501–510.
91. Esser J.P. et al. Comparison of [<sup>177</sup>Lu-DOTA-Tyr3]octreotate and [<sup>177</sup>Lu-DOTA-Tyr3]octreotide: Which peptide is preferable for PRRT? // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2006. Vol. 33. P. 1346–1351.
92. de Long M. et al. Combination Radionuclide Therapy Using <sup>177</sup>Lu- and <sup>90</sup>Y-Labeled Somatostatin Analogs // *J. Nucl. Med.* 2005. Vol. 46, № 1. P. S13–S17.
93. Kunikowska J. et al. Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with <sup>90</sup>Y-DOTATATE and tandem <sup>90</sup>Y/ <sup>177</sup>Lu-DOTATATE: Which is a better therapy option? // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2011. Vol. 38, № 10. P. 1788–1797.
94. Kunikowska J. et al. Tandem peptide receptor radionuclide therapy using <sup>90</sup>Y/<sup>177</sup>Lu-

- DOTATATE for neuroendocrine tumors efficacy and side-effects - polish multicenter experience // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2020. Vol. 47, № 4. P. 922–933.
95. Brabander T., Nonnekens J., Hofland J. The next generation of peptide receptor radionuclide therapy // *Endocr. Relat. Cancer*. 2019. Vol. 26, № 8. P. C7–C11.
  96. Adant S., Shah G.M., Beauregard J.M. Combination treatments to enhance peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2020. Vol. 47, № 4. P. 907–921.
  97. Strosberg J. et al. Phase 3 Trial of <sup>177</sup>Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors // *N. Engl. J. Med.* 2017. Vol. 376, № 2. P. 125–135.
  98. Hennrich U., Kopka K. Lutathera®: The first FDA-and EMA-approved radiopharmaceutical for peptide receptor radionuclide therapy // *Pharmaceuticals*. 2019. Vol. 12. P. 114.
  99. Werner R.A. et al. <sup>68</sup>Gallium- and <sup>90</sup>Yttrium-/<sup>177</sup>Lutetium: “theranostic twins” for diagnosis and treatment of NETs // *Ann. Nucl. Med.* 2015. Vol. 29, № 1. P. 1–7.
  100. Baum R.P. et al. First-in-human study of novel SSTR antagonist <sup>177</sup>Lu-DOTA-LM3 for peptide receptor radionuclide therapy in patients with metastatic neuroendocrine neoplasms: Dosimetry, safety and efficacy // *J. Nucl. Med.* 2021. Vol. 62, № 11. P. 1571–1581.
  101. Dalm S.U. et al. Comparison of the therapeutic response to treatment with a <sup>177</sup>Lu-labeled somatostatin receptor agonist and antagonist in preclinical models // *J. Nucl. Med.* 2016. Vol. 57, № 2. P. 260–265.
  102. Tafreshi N.K. et al. Development of targeted alpha particle therapy for solid tumors // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 23. P. 4314.
  103. Nayak T. et al. A comparison of high- versus low-linear energy transfer somatostatin receptor targeted radionuclide therapy in vitro // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2005. Vol. 20, № 1. P. 52–57.
  104. Nayak T.K. et al. Somatostatin-receptor-targeted  $\alpha$ -emitting <sup>213</sup>Bi is therapeutically more effective than  $\beta$ -emitting <sup>177</sup>Lu in human pancreatic adenocarcinoma cells // *Nucl. Med. Biol.* 2007. Vol. 34, № 2. P. 185–193.
  105. Chan H.S. et al. In Vitro comparison of <sup>213</sup>Bi- and <sup>177</sup>Lu-radiation for peptide receptor radionuclide therapy // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 7. P. 1–16.
  106. Norenberg J.P. et al. <sup>213</sup>Bi-[DOTA-Tyr<sup>3</sup>]octreotide peptide receptor radionuclide therapy of pancreatic tumors in a preclinical animal model // *Clin. Cancer Res.* 2006. Vol. 12, № 3 I. P. 897–903.

107. Miederer M. et al. Preclinical evaluation of the  $\alpha$ -particle generator nuclide  $^{225}\text{Ac}$  for somatostatin receptor radiotherapy of neuroendocrine tumors // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14, № 11. P. 3555–3561.
108. Chan H.S. et al. Influence of tumour size on the efficacy of targeted alpha therapy with  $^{213}\text{Bi}$ -[DOTA-Tyr3]-octreotate // *EJNMMI Res. EJNMMI Research*, 2016. Vol. 6, № 1. P. 1–10.
109. Kratochwil C. et al.  $^{213}\text{Bi}$ -DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2014. Vol. 41, № 11. P. 2106–2119.
110. Zhang J. et al. From Bench to Bedside—The Bad Berka Experience With First-in-Human Studies // *Semin. Nucl. Med.* 2019. Vol. 49, № 5. P. 422–437.
111. Ballal S. et al. Broadening horizons with  $^{225}\text{Ac}$ -DOTATATE targeted alpha therapy for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumour patients stable or refractory to  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE PRRT: first clinical experience on the efficacy and safety // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2020. Vol. 47, № 4. P. 934–946.
112. Müller C. et al. Scandium and terbium radionuclides for radiotheranostics: Current state of development towards clinical application // *Br. J. Radiol.* 2018. Vol. 91. P. 20180074.
113. Pruszyński M. et al. Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter  $^{44}\text{Sc}$  // *Appl. Radiat. Isot.* 2012. Vol. 70, № 6. P. 974–979.
114. Müller C. et al. Preclinical in vivo application of  $^{152}\text{Tb}$ -DOTANOC: a radiolanthanide for PET imaging // *EJNMMI Res. EJNMMI Research*, 2016. Vol. 6. P. 35.
115. Singh A. et al. First-in-Human PET/CT Imaging of Metastatic Neuroendocrine Neoplasms with Cyclotron-Produced  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC: A Proof-of-Concept Study // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2017. Vol. 32, № 4. P. 124–132.
116. Baum R.P. et al. First-in-Human PET/CT Imaging of Metastatic Neuroendocrine Neoplasms with Cyclotron-Produced  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC: A Proof-of-Concept Study // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2017. Vol. 32, № 4. P. 124–132.
117. Koumarianou E. et al. Comparison of receptor affinity of natSc-DOTA-TATE versus natGa-DOTA-TATE // *Nucl. Med. Rev.* 2011. Vol. 14, № 2. P. 85–89.
118. Müller C. et al. Future prospects for SPECT imaging using the radiolanthanide terbium-155 - production and preclinical evaluation in tumor-bearing mice // *Nucl. Med. Biol.* 2014. Vol. 41. P. 58–65.
119. de Jong M. et al. Evaluation in vitro and in rats of  $^{161}\text{Tb}$ -DTPA-octreotide, a somatostatin analogue with potential for intraoperative scanning and radiotherapy // *Eur. J. Nucl. Med.*

1995. Vol. 22, № 7. P. 608–616.
120. Lehenberger S. et al. The low-energy  $\beta$  - and electron emitter  $^{161}\text{Tb}$  as an alternative to  $^{177}\text{Lu}$  for targeted radionuclide therapy // *Nucl. Med. Biol.* Elsevier Inc., 2011. Vol. 38, № 6. P. 917–924.
  121. Baum R.P. et al. First-in-Humans Application of  $^{161}\text{Tb}$ : A Feasibility Study Using  $^{161}\text{Tb}$ -DOTATOC // *J. Nucl. Med.* 2021. Vol. 62, № 10. P. 1391–1397.
  122. Wharton L. et al. Preclinical Evaluation of [ $^{155}/^{161}\text{Tb}$ ]Tb-Crown-TATE-A Novel SPECT Imaging Theranostic Agent Targeting Neuroendocrine Tumours // *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 7. P. 1–16.
  123. Gracheva N. et al. Production and characterization of no-carrier-added  $^{161}\text{Tb}$  as an alternative to the clinically-applied  $^{177}\text{Lu}$  for radionuclide therapy // *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 2019. Vol. 4, № 1. P. 12.
  124. IAEA. Research Reactor Database (RRDB) [Electronic resource].
  125. Tárkányi F. et al. Investigation of production routes for the  $^{161}\text{Ho}$  Auger-electron emitting radiolanthanide, a candidate for therapy // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2013. Vol. 298, № 1. P. 277–286.
  126. Tsechanski A. et al. Electron accelerator-based production of molybdenum-99: Bremsstrahlung and photoneutron generation from molybdenum vs. tungsten // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* Elsevier B.V., 2016. Vol. 366. P. 124–139.
  127. Nakai K. et al. Feasibility studies towards future self-sufficient supply of the  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  isotopes with Japanese accelerators // *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2014. Vol. 90, № 10. P. 413–421.
  128. Galea R., Ross C., Wells R.G. Reduce, reuse and recycle: A green solution to Canada's medical isotope shortage // *Appl. Radiat. Isot.* Elsevier, 2014. Vol. 87. P. 148–151.
  129. Starovoitova V.N., Cole P.L., Grimm T.L. Accelerator-based photoproduction of promising beta-emitters  $^{67}\text{Cu}$  and  $^{47}\text{Sc}$  // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* Springer Netherlands, 2015. Vol. 305, № 1. P. 127–132.
  130. Aliev R.A. et al. Photonuclear production and radiochemical separation of medically relevant radionuclides:  $^{67}\text{Cu}$  // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* Springer International Publishing, 2019. Vol. 321, № 1. P. 125–132.
  131. Mamtimin M., Harmon F., Starovoitova V.N. Sc-47 production from titanium targets using electron linacs // *Appl. Radiat. Isot.* Elsevier, 2015. Vol. 102. P. 1–4.
  132. Rotsch D.A. et al. Electron linear accelerator production and purification of scandium-47 from titanium dioxide targets // *Appl. Radiat. Isot.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 131. P. 77–82.

133. Aliev R.A. et al. Photonuclear production of medically relevant radionuclide  $^{47}\text{Sc}$  // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* Springer International Publishing, 2020. Vol. 326, № 2. P. 1099–1106.
134. Kazakov A.G. et al. Production of  $^{177}\text{Lu}$  by hafnium irradiation using 55-MeV bremsstrahlung photons // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* Springer International Publishing, 2018. Vol. 317, № 3. P. 1469–1476.
135. Aliev R.A. et al. Production of medical radioisotope  $^{167}\text{Tm}$  by photonuclear reactions on natural ytterbium // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* Elsevier B.V., 2021. Vol. 508, № September. P. 19–23.
136. Bodnar E.N., Dikiy M.P., Medvedeva E.P. Photonuclear production and antitumor effect of radioactive cisplatin ( $^{195\text{m}}\text{Pt}$ ) // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* Springer Netherlands, 2015. Vol. 305, № 1. P. 133–138.
137. Dykiy M.P. et al. Photonuclear production of  $^{193\text{m}},^{195\text{m}}\text{Pt}$  and synthesis of radioactive cisplatin // *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2007. Vol. 50, № 5–6. P. 480–482.
138. Dorrer H. et al. Folate Receptor Targeted Alpha-Therapy Using Terbium-149 // *Pharmaceuticals.* 2014. Vol. 7, № 3. P. 353–365.
139. Grundler P. et al. Addendum to the ISOLDE and Neutron Time-of-Flight Committee Terbium-149 for targeted alpha therapy. 2023. Vol. 10, № January. 1–8 p.
140. Aliev R.A. et al. Production of a Short-Lived Therapeutic  $\alpha$ -Emitter  $^{149}\text{Tb}$  by Irradiation of Europium by 63 MeV  $\alpha$ -Particles // *At. Energy.* 2021. Vol. 129, № 6. P. 337–340.
141. Moiseeva A.N. et al. Cross section measurements of  $^{151}\text{Eu}(^3\text{He},^5\text{n})$  reaction: new opportunities for medical alpha emitter  $^{149}\text{Tb}$  production // *Sci. Rep.* Springer US, 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–7.
142. Walrand S. et al. Quantitation in PET using isotopes emitting prompt single gammas: Application to yttrium-86 // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2003. Vol. 30, № 3. P. 354–361.
143. Helisch A. et al. Pre-therapeutic dosimetry and biodistribution of  $^{86}\text{Y}$ -DOTA-Phe1-Tyr3-octreotide versus  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide in patients with advanced neuroendocrine tumours // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2004. Vol. 31, № 10. P. 1386–1392.
144. Clifford T. et al. Validation of a novel CHX-A'' derivative suitable for peptide conjugation: Small animal PET/CT imaging using yttrium-86-CHX-A''- octreotide // *J. Med. Chem.* 2006. Vol. 49, № 14. P. 4297–4304.
145. Jamar F. et al.  $^{86}\text{Y}$ -DOTA0-D-Phe1-Tyr3-octreotide (SMT487) - A phase 1 clinical study: Pharmacokinetics, biodistribution and renal protective effect of different regimens of amino acid co-infusion // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2003. Vol. 30, № 4. P. 510–

518.

146. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th edition. National Academies Press, 2010. 1–246 p.
147. Rösch F., Qaim S.M., Stöcklin G. Nuclear Data Relevant to the Production of the Positron Emitting Radioisotope  $^{86}\text{Y}$  via the  $^{86}\text{Sr}(p,n)$ - and  $\text{natRb}(^3\text{He},xn)$ -Processes // *Radiochim. Acta*. 1993. Vol. 61, № 1. P. 1–8.
148. Kelley L.A. et al. The Pyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis // *Nat. Protoc.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 10, № 6. P. 845–858.
149. Bateman A. et al. UniProt: A hub for protein information // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43, № D1. P. D204–D212.
150. Berendsen H.J.C., Spoel D. Van Der, Drunen R. Van. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation // *Comput. Phys. Commun.* 1995. Vol. 91. P. 43–56.
151. Schuler L.D., Daura X., Gunsteren W.F.V.A.N. An Improved GROMOS96 Force Field for Aliphatic Hydrocarbons in the Condensed Phase // *J. Comput. Chem.* 2001. Vol. 22, № 11. P. 1205–1218.
152. Воеводин В.В. et al. Практика суперкомпьютера " Ломоносов " // *Открытые системы*. 2012. № 7. P. 36–39.
153. Berger O., Edholm O., Jähnig F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature // *Biophys. J.* 1997. Vol. 72, № 5. P. 2002–2013.
154. Morris G.M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility // *J. Comput. Chem.* 2009. Vol. 30, № 16. P. 2785–2791.
155. van Aalten D.M.F. et al. PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules \* // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 1996. Vol. 10. P. 255–262.
156. Shannon R.D. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides Central Research and Development Department, Experimental Station, E . L Du Pont de Nemours The effective ionic radii of Shannon & Prewitt [ *Acta* // *Acta Crystallogr. Sect. A*. 1976. Vol. 32. P. 751–767.
157. Baes C.F., Mesmer R.E. *The Hydrolysis of Cations*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1976. 1–489 p.
158. Bodei L. et al. Peptide receptor radionuclide therapy with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE: the IEO phase I-II study // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2011. Vol. 38, № 12. P. 2125–2135.
159. Grillo-López A.J. Zevalin: The first radioimmunotherapy approved for the treatment of

- lymphoma // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2002. Vol. 2, № 5. P. 485–493.
160. Huclier-markai S. et al. Optimization of reaction conditions for the radiolabeling of DOTA and DOTA-peptide with  $^{44}\text{m} / ^{44}\text{Sc}$  and experimental evidence of the feasibility of an in vivo PET generator // *Nucl. Med. Biol.* Elsevier B.V., 2013.
161. Cukrowski I. et al. The effect of chelate ring size on metal ion size-based selectivity in polyamine ligands containing pyridyl and saturated nitrogen donor groups // *Anal. Chim. Acta.* 1995. Vol. 312, № 3. P. 307–321.
162. Desreux J.F., Merciny E., Loncin M.F. Nuclear magnetic resonance and potentiometric studies of the protonation scheme of two tetraaza tetraacetic macrocycles // *Inorg. Chem.* 1981. Vol. 20, № 4. P. 987–991.
163. Moreau J. et al. Complexing mechanism of the lanthanide cations  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , and  $\text{Tb}^{3+}$  with 1,4,7,10-tetrakis (carboxymethyl)-1,4,7, 10-tetraazacyclododecane (dota) - characterization of three successive complexing phases: Study of the thermodynamic and structural properti // *Chem. - A Eur. J.* 2004. Vol. 10, № 20. P. 5218–5232.
164. Morgenstern A. et al. Optimizing labelling conditions of  $^{213}\text{Bi}$ -DOTATATE for preclinical applications of peptide receptor targeted alpha therapy // *EJNMMI Radiopharm. Chem. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 2016. Vol. 1, № 1. P. 1–15.
165. Feng Y. et al. Radiolabeling, quality control, biodistribution, and imaging studies of  $^{177}\text{Lu}$ -ibandronate // *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2018. Vol. 62, № 1. P. 43–51.
166. Breeman W.A.P. et al. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  and  $^{177}\text{Lu}$  at high specific activities // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2003. Vol. 30, № 6. P. 917–920.
167. 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.* Elsevier Inc., 2018. Vol. 60. P. 1–10.
168. 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, № 4. P. 727–735.
169. Veber D.F. et al. Conformationally Restricted Bicyclic Analogs of Somatostatin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1978. Vol. 75, № 6. P. 2636–2640.
170. Veber D.F. et al. Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced ring size [24] // *Nature.* 1979. Vol. 280, № 5722. P. 512–514.
171. Krohn K.A., Link J.M. Interpreting enzyme and receptor kinetics: Keeping it simple, but not too simple // *Nucl. Med. Biol.* 2003. Vol. 30, № 8. P. 819–826.

172. Brahms S., Brahms J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 138, № 2. P. 149–178.
173. Migliore M. et al. Characterization of  $\beta$ -turns by electronic circular dichroism spectroscopy: A coupled molecular dynamics and time-dependent density functional theory computational study // *Phys. Chem. Chem. Phys.* Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 22, № 3. P. 1611–1623.
174. Heppeler A. et al. Radiometal-labelled macrocyclic chelator-derivatised somatostatin analogue with superb tumour-targeting properties and potential for receptor-mediated internal radiotherapy // *Chem. - A Eur. J.* 1999. Vol. 5, № 7. P. 1974–1981.
175. Lubberink M. et al. In vivo instability of  $^{177}\text{Lu}$ -dotatate during peptide receptor radionuclide therapy // *J. Nucl. Med.* 2020. Vol. 61, № 9. P. 1337–1340.
176. Nakamura Y. et al. Differences in behavior among the chlorides of seven rare earth elements administered intravenously to rats // *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997. Vol. 37, № 2. P. 106–116.
177. Shinohara A., Chiba M., Inaba Y. Distribution of Terbium and Increase of Calcium Concentration in the Organs of Mice iv-Administered with Terbium Chloride // *Biomed. Environ. Sci.* 1997. Vol. 10, № 1. P. 73–84.
178. Cassells I. et al. Radiolabeling of Human Serum Albumin With Terbium-161 Using Mild Conditions and Evaluation of in vivo Stability // *Front. Med.* 2021. Vol. 8. P. 1–12.
179. Yamada Y. et al. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89, № 1. P. 251–255.
180. Bates C.M. et al. Expression of somatostatin receptors 3, 4, and 5 in mouse kidney proximal tubules // *Kidney Int.* 2003. Vol. 63, № 1. P. 53–63.
181. Cotton S. Lanthanide and Actinide Chemistry // *Lanthanide and Actinide Chemistry.* 2006. 1–263 p.
182. Morcos S.K. Extracellular gadolinium contrast agents: Differences in stability // *Eur. J. Radiol.* 2008. Vol. 66, № 2. P. 175–179.



## Приложение

1.

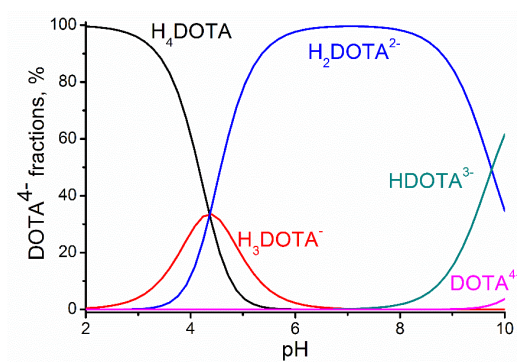
Таблица П1. Радионуклиды, идентифицированные в мишени, их активности и выходы.

Радио- нуклид	$T_{1/2}$	Пути образования	Гамма-линии, кэВ (%)	Актив- ность на ЕОВ, Бк	Выход, $\text{кБк} \cdot \text{мкА}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{ГДy}_{2\text{O}_3}^{-1}$
$^{155}\text{Dy}$	9,9 ч	$^{156}\text{Dy}(\gamma, n)$ $^{158}\text{Dy}(\gamma, 3n)$	226,918 (68,7); 184,564 (3,39); 905,8 (2,46); 999,7 (2,45); 664,173 (2,25); 1155,47 (2,10); 498,617 (1,76); 1166,22 (1,70)	940±170	25±4
$^{157}\text{Dy}$	8,14 ч	$^{158}\text{Dy}(\gamma, n)$ $^{160}\text{Dy}(\gamma, 3n)$	326,336 (93); 182,424 (1,33); 265,469 (0,17)	8800±500	249±15
$^{155}\text{Tb}$	5,32 д	$^{155}\text{Dy} \rightarrow ^{155}\text{Tb}$ $^{156}\text{Dy}(\gamma, p)$ $^{158}\text{Dy}(\gamma, p2n)$	105,318 (25,1)	44,9±5,9	1,6±0,3*
$^{160}\text{Tb}$	72,3 д	$^{161}\text{Dy}(\gamma, p)$ $^{162}\text{Dy}(\gamma, pn)$ $^{163}\text{Dy}(\gamma, p2n)$	879,378 (30,1); 298,578 (26,1); 966,166 (25,1)	48,5±3,2	1,0±0,1
$^{161}\text{Tb}$	6,89 д	$^{162}\text{Dy}(\gamma, p)$ $^{163}\text{Dy}(\gamma, pn)$ $^{164}\text{Dy}(\gamma, p2n)$	25,651 (23,2); 74,567 (10,2)	668±15	14,4±0,3
$^{163}\text{Tb}$	19,5 мин	$^{164}\text{Dy}(\gamma, p)$	351,2 (26); 389,8 (24); 494,5 (22,5); 421,9 (11,5); 533,0 (9,5); 316,4 (8,3); 250,8 (6,7); 347,8 (6,2); 338,5 (4,5)	7000±900	2200±300

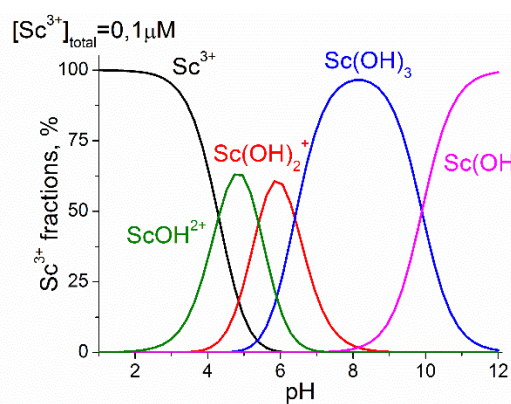
\* Активность  $^{155}\text{Tb}$  рассчитана на 40 часов после ЕОВ, когда накопление  $^{155}\text{Tb}$  из  $^{155}\text{Dy}$  проходит через максимум, исходя из выхода  $^{155}\text{Dy}$ .

## 2. Распределение форм ионов в зависимости от pH раствора

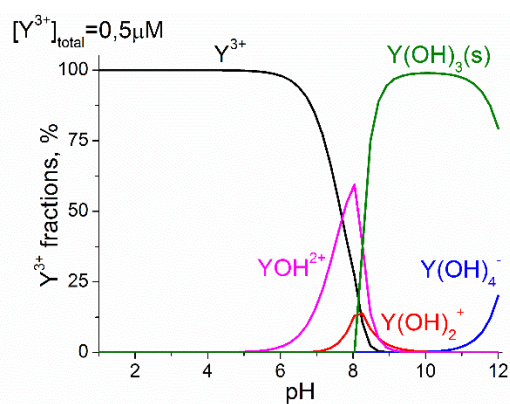
а)



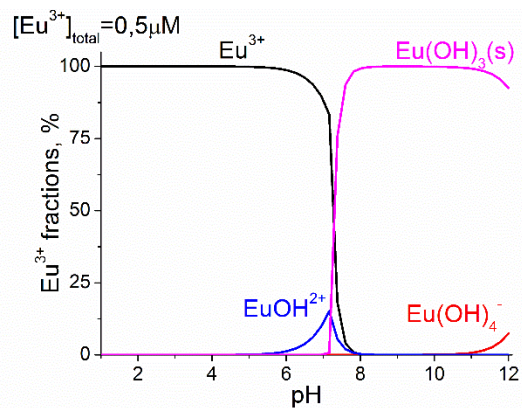
б)



в)



г)



д)

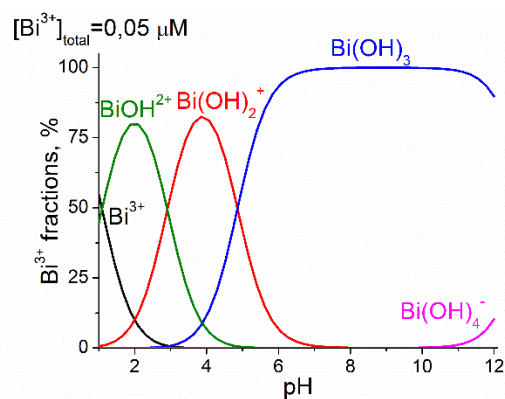


Рис. П1. Распределение форм ионов в зависимости от pH раствора а) DOTA, б) Sc<sup>3+</sup>, в) Y<sup>3+</sup>, г) Eu<sup>3+</sup>, д) Bi<sup>3+</sup>.

3. Результаты автордиографии ТСХ пластин для комплекса  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P1}$  при значениях pH 2.3, pH 5.7 и pH 8.0.

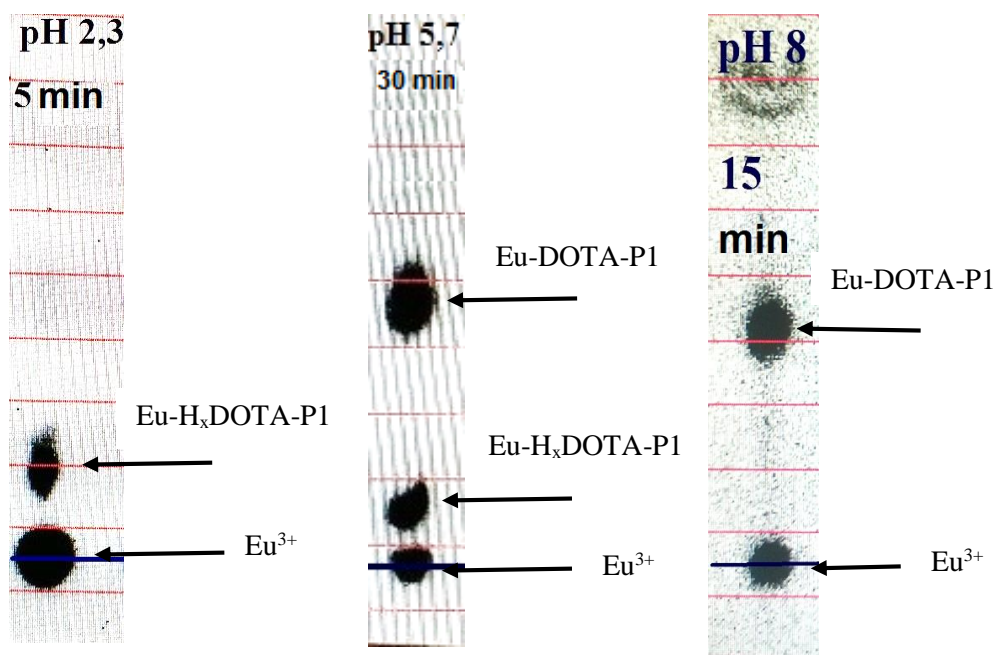


Рис. П2. Результаты автордиографии ТСХ пластин для комплекса  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P1}$  при значениях pH 2.3, pH 5.7 и pH 8.0.

#### 4. Результаты ВЭЖХ и ТСХ для комплексов $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P2}$

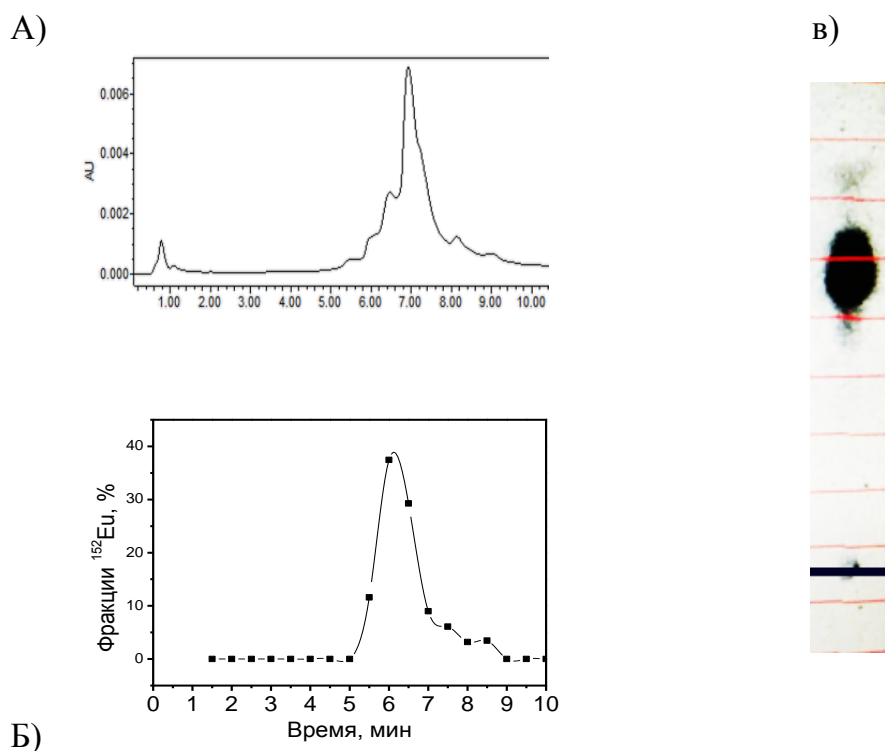


Рис. ПЗ.  $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$  Eu-DOТА-P2,  $37^\circ\text{C}$ , pH 8, степень мечения (по ТСХ) 91%. а) ВЭЖХ хроматограмма б) результаты измерения фракций ВЭЖХ, в) автордиограмма ТСХ.

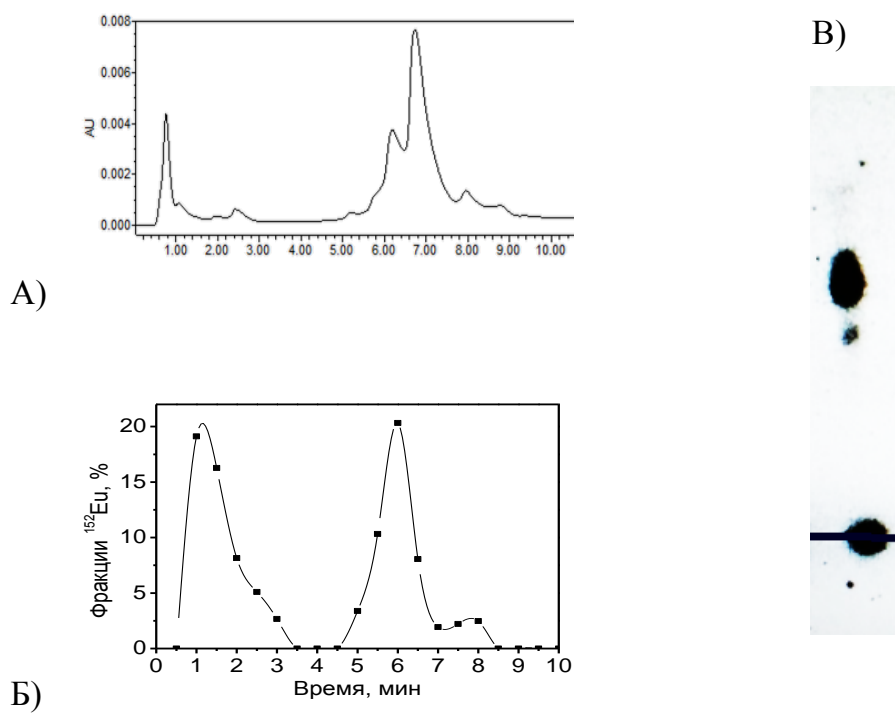


Рис. П4.  $1 \cdot 10^{-4}$ М Eu-ДОТА-Р2, 90°C, рН 5, степень мечения (по ТСХ) 51%. а) ВЭЖХ хроматограмма б) результаты измерения фракций ВЭЖХ, в) автордиограмма ТСХ.

5. Результаты ВЭЖХ для комплексов  $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi-L-P1}$  и  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$ .

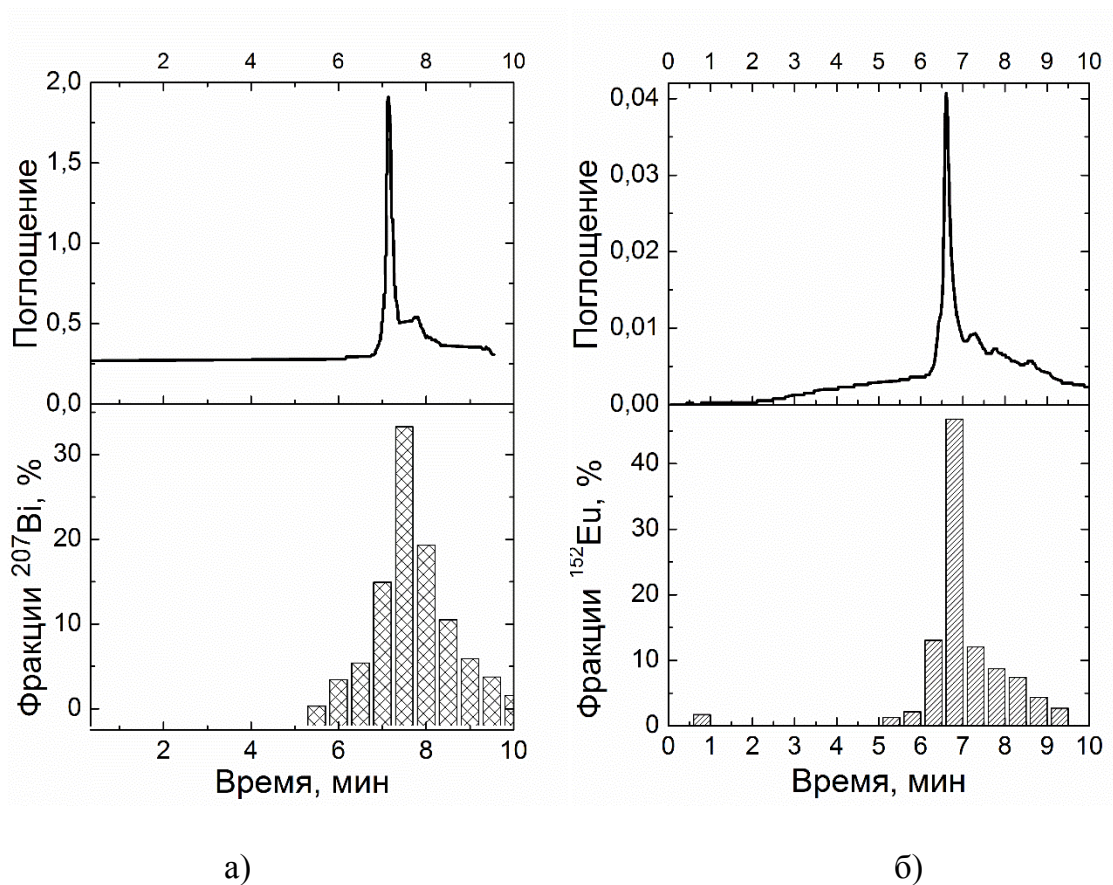


Рис.П5. Результаты ВЭЖХ для комплексов а)  $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi-L-P1}$ , б)  $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOТА-P4}$ .

## Благодарности

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

Автор выражает благодарность Хачатрянцу 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 Любви 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 Любви 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.