

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Федотовой Анжелики Олеговны «Комплексы Sc^{3+} , Y^{3+} , $\text{Tb}^{3+}(\text{Eu}^{3+})$ и Bi^{3+} с конъюгатами коротких аналогов соматостатина для диагностики и терапии онкологических заболеваний», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.13 - Радиохимия

Представленная диссертация посвящена изучению конъюгатов линейных тетра- и пентапептидов, содержащих аминокислотную последовательность Phe-Trp-Lys-Thr, и их комплексов с радионуклидами, перспективными для ядерной медицины. Поскольку исследуемые конъюгаты рассматриваются в качестве аналогов соматостатина, применение их комплексов наиболее востребовано в области пептид-рецепторной радионуклидной диагностики и терапии нейроэндокринных опухолей, которые характеризуются повышенной экспрессией рецепторов этого гормона. По сравнению с распространенными сейчас аналогами соматостатина короткие пептиды менее подвержены протеолизу, дольше присутствуют в кровеносном русле, кроме того, их конъюгаты позволяют проводить быстрый синтез комплексов с катионами металлов при повышенной температуре (до $90\text{ }^{\circ}\text{C}$), что особенно важно в случае короткоживущих радионуклидов, поэтому **актуальность работы** и ее практическая значимость не вызывают сомнений.

Цель работы заключалась в определении условий получения и перспективности применения комплексов конъюгатов коротких пептидов с радионуклидами ^{44}Sc , ^{90}Y , ^{161}Tb , $^{212,213}\text{Bi}$ в качестве основных составляющих радиофармпрепаратов. Достижение цели потребовало решения широкого круга задач как теоретических, так и практических, в которых вместо изотопов тербия и висмута использовались их долгоживущие аналоги ^{152}Eu и ^{207}Bi :

- определение оптимальных параметров для синтеза комплексов пептидных конъюгатов и изучение их поведения *in vitro* и *in vivo*;

- теоретическое и экспериментальное определение сродства исследуемых конъюгатов к целевым рецепторам, а также анализ вторичной структуры пептидных конъюгатов и их комплексов с металлами.

Поскольку синтез и изучение свойств ультракоротких аналогов соматостатина являются одной из современных тенденций в области исследования пептидных противоопухолевых препаратов, результаты, полученные в данной работе, обладают **научной новизной**, а именно:

1. Впервые получены данные об устойчивости комплексов исследуемых пептидных конъюгатов с радионуклидами ^{44}Sc , ^{90}Y , ^{161}Tb , ^{152}Eu , ^{207}Bi в условиях *in vitro* и *in vivo*, и предложен конъюгат Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr-DOTA для применения в качестве биологического вектора.
2. Впервые получены данные о сродстве исследуемых пептидных конъюгатов к рецепторам соматостатина на поверхности клеток нейробластомы человека.
3. Впервые изучен тип вторичной структуры исследуемых пептидных конъюгатов.

Результаты работы имеют **практическую ценность** при разработке диагностических и терапевтических радиофармпрепаратов на основе конъюгатов ультракоротких пептидов, меченных радионуклидами редкоземельных элементов и висмута. Полученные в работе данные о сродстве исследуемых конъюгатов к рецепторам соматостатина, влиянии расположения хелатирующей группы по отношению к пептидной последовательности на связывание радионуклида могут использоваться при создании и испытании новых более эффективных пептидных конъюгатов для ядерной медицины.

Диссертация состоит из введения, восьми глав, выводов, списка литературы, а также включает приложения и список условных обозначений и сокращений. Работа изложена на 119 страницах, содержит 62 рисунка, 19 таблиц и 182 библиографические ссылки.

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, отражена новизна работы и область практического применения, приведены положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы (глава 1) рассмотрены структура и свойства гормона соматостатина и его различных пептидных и непептидных аналогов, подробно описаны основной аналог октреотид, другие выпускаемые сейчас коммерческие аналоги и их сродство к рецепторам соматостатина. Особое внимание диссертант уделила анализу подходов к получению новых аналогов соматостатина, включая тенденцию к созданию ультракоротких аналогов, в рамках которой выполнена данная работа. В обзоре рассмотрена конъюгация октреотида и других аналогов с хелаторами, наиболее распространенными для связывания катионов радиоактивных металлов в комплекс, а именно, ДОТА, ДТРА и их производными, приведены примеры комплексов конъюгатов с радионуклидами, в том числе нашедших применение в радиофармацевтической практике. На основании литературного обзора сделан вывод об актуальности изучения конъюгатов ультракоротких пептидных аналогов соматостатина с хелатором ДОТА и их комплексов с радиоактивными изотопами РЗЭ и висмута.

Экспериментальная часть (глава 2) содержит описание методик мечения исследуемых конъюгатов радионуклидами и анализа получаемых комплексов с помощью тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ), методик определения устойчивости комплексов *in vitro* в физиологическом растворе, в сыворотке и в присутствии биологически значимых катионов. Описаны экспериментальные и расчетные методы анализа сродства исследуемых конъюгатов к рецепторам соматостатина, изучения вторичной структуры конъюгатов с помощью спектроскопии кругового дихроизма, а также способ фотоядерного получения и выделения радионуклида ^{161}Tb . Приведены условия экспериментов *in vivo* на лабораторных мышах, которым прививались клетки IMR-32 нейробластомы человека. Следует отметить разнообразие современных физико-химических и биохимических методов, используемых диссертантом А.О. Федотовой для решения намеченных в работе задач и достижения поставленной цели.

Полученные результаты систематизированы и проанализированы в следующих шести главах.

В главе 3 приведены результаты мечения четырех конъюгатов DOTA-P, отличающихся местом связи с DOTA, количеством аминокислот (АК) и дополнительным From-фрагментом, радионуклидами ^{44}Sc , ^{90}Y , ^{152}Eu , ^{207}Bi в зависимости от температуры, концентрации конъюгата, pH и длительности синтеза. Получены любопытные экспериментальные данные, например, методом ТСХ показан процесс постепенного депротонирования образующихся комплексов Bi-DOTA-P1 и Eu-DOTA-P1. Обнаружено, что увеличение числа аминокислот с четырех до пяти и взаимное расположение аминокислотной последовательности и DOTA может кардинально повлиять на связывание одного и того же элемента. Так, комплексообразование конъюгата DOTA-Phe-D-Trp-Lys-Thr (DOTA-P1) с ^{90}Y одинаково эффективно в диапазоне pH 3,8-8,2, тогда как степень мечения тем же радионуклидом конъюгата DOTA-Thz-Phe-D-Trp-Lys-Thr (DOTA-P2), в цепочку которого добавлена одна АК, меняется в пределах 5-100% с максимумом в районе pH 4. Тщательное исследование и объяснение подобных зависимостей, очевидно, выходит за рамки диссертации, оставляя задел для дальнейшей работы.

Изучено также связывание ^{207}Bi с конъюгатом L-P1, в котором хелатор DOTA заменен на бензоазакраун-лиганд L, способный быстро образовывать устойчивые комплексы с катионами висмута при комнатной температуре. На основе полученных данных сформулированы оптимальные условия синтеза комплексов исследуемых пептидных конъюгатов с радионуклидами ^{44}Sc , ^{90}Y , ^{152}Eu , ^{207}Bi .

Глава 4 посвящена изучению *in vitro* стабильности меченных комплексов в бычьей сыворотке, в физиологическом растворе и в присутствии биологически значимых катионов. Показано, что полученные комплексы обладают удовлетворительной устойчивостью в данных средах, за исключением Bi-DOTA-P3 и Bi-L-P1, оказавшихся недостаточно стабильными в сыворотке.

В главе 5 проведен анализ сродства конъюгатов и меченных комплексов к рецепторам соматостатина. Результаты расчетов, выполненных методами гомологического моделирования, молекулярной динамики и молекулярного

докинга, дали основание предположить, что исследуемые пептиды P1-P4 связываются с рецептором SSTR2 так же, как и наиболее распространенный аналог соматостатина октреотид. Результаты экспериментального анализа, проведенного методом конкурентного связывания с клетками IMR-32, подтвердили наличие специфического связывания, при этом среди исследованных комплексов наибольшее сродство продемонстрировал комплекс Eu-DOTA-P4.

В главе 6 приведены результаты исследования вторичной структуры четырех DOTA-конъюгатов, а также их комплексов со скандием с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Анализ полученных данных показал, что на вторичную структуру пептидных конъюгатов влияет не только их состав, но и положение отдельных фрагментов относительно аминокислотной последовательности, и позволил автору заключить, что конъюгат DOTA-P4 обладает наиболее стабильной вторичной структурой как в исходном состоянии, так и в виде комплекса с металлом.

В главе 7 представлены данные по биораспределению меченного комплекса $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$, продемонстрировавшего лучшие результаты на предыдущих этапах исследования, и его устойчивости в условиях живого организма в сравнении с поведением комплекса $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTATATE}$, выступающего в качестве положительного контроля, и свободного катиона $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu}^{3+}$. На основе полученных данных диссертант делает вывод об устойчивости комплекса $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$ в условиях *in vivo* на мышах с привитыми опухолями IMR-32 в течение 6 часов.

В главе 8 проведено сравнение комплексов $[^{152}\text{Eu}]\text{Eu-DOTA-P4}$ и $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOTA-P4}$. Показано, что сходные условия синтеза приводят к близким величинам степени мечения DOTA-P4 катионами ^{161}Tb и ^{152}Eu . Кроме того, оба комплекса проявляют одинаковую устойчивость в сыворотке в течение суток. Полученные результаты подтвердили возможность использования Eu^{3+} как химического аналога Tb^{3+} .

Достоверность результатов работы определяется использованием современных экспериментальных и расчетных методов, а также взаимным согласием результатов, полученных различными методами. Выносимые на защиту положения и выводы подтверждены экспериментальными данными и результатами расчетов. Основные результаты и выводы диссертации полностью соответствуют поставленным задачам.

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

При общей высокой оценке работы по тексту диссертации возникли следующие **вопросы и замечания**.

1. Сравнение двух способов наработки ^{161}Tb – реакторного и фотоядерного, использованного в данной работе, показывает: а) производительность первого способа значительно выше; б) при облучении мишени, содержащей природный или обогащенный диспрозий, тормозными γ -квантами образуется примесь долгоживущего изотопа тербия ^{160}Tb , тогда как в ^{161}Tb , произведенном в реакторе, этой примеси нет. Поэтому фотоядерный метод получения ^{161}Tb для нужд ядерной медицины представляется неперспективным.
2. Выделение фракции тербия из облученной мишени, содержащей 20 мг диспрозия, было проведено методом экстракционной хроматографии на смоле LN Resin, при этом выход ^{161}Tb составил всего 39%. Оптимизация методики выделения ^{161}Tb выходит за рамки задач, поставленных в данной работе, тем не менее было бы уместно дополнить литературный обзор ссылками на работы по разделению Tb, Dy и других РЗЭ различными методами. Это усилило бы радиохимическую составляющую диссертации.
3. Из полученных данных по устойчивости в сыворотке комплексов Vi-L-P1 и Vi-L следует, что комплекс висмута с лигандом L уже недостаточно стабилен (Рис. 43). Непонятно, зачем синтезировать пептидный комплекс Vi-L-P1, если *a priori*

очевидно, что он не будет более устойчив, чем комплекс с интактным лигандом. Кроме того, осталось неясным, почему не были получены и исследованы комплексы редкоземельных элементов Sc, Y и Eu с лигандом L и конъюгатом L-P1.

4. На основании спектров кругового дихроизма, полученных для свободных конъюгатов и конъюгатов в комплексе со скандием, автор делает вывод, что конъюгат DOTA-P4 обладает необходимой конформацией β -поворот (β -петля) в свободной форме и в комплексе с металлом (вывод 5). В то же время, Sc^{3+} имеет наименьший радиус среди исследованных ионов металлов. Будет ли сохраняться необходимая вторичная структура в комплексе DOTA-P4 с остальными металлами?

5. В работе встречаются опечатки и неточные или неудачные формулировки, например:

- раздел 1.11 называется «Аналоги соматостатина, меченые $^{212,213}Bi$ », но в тексте нет ссылок на работы с ^{212}Bi ;

- в разделе 1.12 приводятся ядерно-физические характеристики ^{161}Tb , включая «излучение бета-частиц с энергией 135, 154 и 180 кэВ», однако не указано, какая энергия – средняя или максимальная;

- ссылки [115] и [116] относятся к одной и той же работе.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.13 – Радиохимия и критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертация оформлена согласно требованиям Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель **Федотова Анжелика Олеговна** заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.13 – Радиохимия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

ведущий научный сотрудник лаборатории радиоизотопного комплекса

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт ядерных исследований Российской академии наук (ИЯИ РАН)



07.11.2023

Ермолаев Станислав Викторович