



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология  
ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»

### ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРАНТА

Тема работы
Исследование <i>in vitro</i> нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3-(G <sub>3</sub> S) <sub>3</sub> C и технеция-99m

УДК 615.012-026.63:577.112:546.718

Обучающийся

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Фоминых Анастасия Сергеевна		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		

### КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Маланина В.А	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Авдеева И.И.	-		

### ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Романенко С.В.	д.х.н.		

**ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОСВОЕНИЯ ООП  
«Перспективные химические и биомедицинские технологии»**

<b>Код компетенции</b>	<b>Наименование компетенции</b>
<b>Универсальные компетенции</b>	
УК(У)-1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, выработать стратегию действий;
УК(У)-2	Способен управлять проектом на всех этапах его жизненного цикла;
УК(У)-3	Способен организовывать и руководить работой команды, вырабатывая командную стратегию для достижения поставленной цели;
УК(У)-4	Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном (-ых) языке (-ах), для академического и профессионального взаимодействия;
УК(У)-5	Способен анализировать и учитывать разнообразие культур в процессе межкультурного взаимодействия;
УК(У)-6	Способен определять и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки.
<b>Общепрофессиональные компетенции</b>	
ОПК(У)-1	Способен организовать самостоятельную и коллективную научно-исследовательскую работу, разрабатывать планы и программы проведения научных исследований и технических разработок;
ОПК(У)-2	Способен использовать современные приборы и методики, организовать проведение экспериментов и испытаний, проводить их обработку и анализировать их результаты
ОПК(У)-3	Способен разрабатывать нормы выработки, технологические нормативы на расход материалов, заготовок, топлива и электроэнергии, контролировать параметры технологического процесса, выбирать оборудование и технологическую оснастку
ОПК(У)-4	Способен находить оптимальные решения при создании продукции с учетом требований качества, надежности и стоимости, а также сроков исполнения, безопасности жизнедеятельности и экологической чистоты.
<b>Профессиональные компетенции выпускников</b>	
ПК(У)-1	Способен к поиску, обработке, анализу и систематизации научно-технической информации по теме исследования, выбору методик и средств решения задачи
ПК(У)-2	Способен к созданию химических соединений, материалов и изделий биомедицинского назначения и (или) их физико-химического анализа
ПК(У)-3	Способен к применению методов математического моделирования химических соединений, материалов биомедицинского назначения и процессов химических и биомедицинских технологий
ПК(У)-4	Способен к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности
ПК (У)-5	Способен проектировать и организовывать учебный процесс по образовательным программам с использованием современных образовательных технологий



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология  
ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»

УТВЕРЖДАЮ:  
Руководитель ООП  
18.04.01 Химическая технология  
\_\_\_\_\_ С.В. Романенко  
14.03.2023 г.

**ЗАДАНИЕ**  
на выполнение выпускной квалификационной работы

Обучающийся:

Группа	ФИО
9ДМ11	Фоминых Анастасия Сергеевна

Тема работы:

Исследование <i>in vitro</i> нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3-(G <sub>3</sub> S) <sub>3</sub> C и технеция-99м	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	34-38/с от 03.02.2023 г.

Срок сдачи обучающимся выполненной работы:	13.06.2023 г.
--	---------------

**ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:**

<b>Исходные данные к работе</b>	<p>Объект исследования: HER2 направленные сконструированные белки DARPin G3 с хелатными группами.</p> <p>Предмет исследования: оценка специфичности, интернализации и аффинности нового радиофармпрепарата на основе DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C.</p> <p>Провести оценку <i>in vitro</i> специфичности, процессинга и равновесной константы диссоциации сконструированной молекулы на основе DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C, как перспективного агента для радиодиагностики опухолей, с использованием культур клеток в качестве биологических моделей.</p>
<b>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</b>	<p>Литературный обзор по тематике научно-исследовательской работы.</p> <p>Освоение комплекса культуральных и молекулярно-биологических методик и</p>

	<p>выполнение полного цикла исследований свойств скаффолда на клеточных культурах <i>in vitro</i>.</p> <p>Анализ и обсуждение результатов проведенного исследования.</p> <p>Анализ ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.</p> <p>Анализ рисков и опасностей проведения исследования и составления перечня нормативов для их регулирования.</p> <p>Формулировка выводов и заключений по работе.</p>
<b>Перечень графического материала</b>	Не предусмотрено

**Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы** (с указанием разделов)

Раздел	Консультант
Социальная ответственность	Старший преподаватель, Авдеева И.И.
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	К.э.н., доцент ОСГН ШБИП, Маланина В.А.
Раздел ВКР на иностранном языке	К.п.н., доцент ОИЯ, Гончарова Л.А.

**Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:**

**Название разделов на русском языке:** введение, литературный обзор, экспериментальная часть, результаты исследования, социальная ответственность, финансовый менеджмент ресурсоэффективность и ресурсосбережение, заключение.

**Название разделов на иностранном языке:** литературный обзор.

<b>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</b>	14.03.2023 г.
---	---------------

**Задание выдал руководитель:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		14.03.2023 г.

**Задание принял к исполнению обучающийся:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Фоминых Анастасия Сергеевна		14.03.2023 г.



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий  
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология  
ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»  
Уровень образования магистратура  
Период выполнения весенний семестр 2022/2023 учебного года

**КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН  
выполнения выпускной квалификационной работы**

Обучающийся:

Группа	ФИО
9ДМ11	Фоминых А.С.

Тема работы:

Исследование in vitro нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3-(G<sub>3S</sub>)<sub>3</sub>C и технеция-99m

Срок сдачи студентом выполненной работы: 15.06.2023 г.

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
22.03.2023 г.	Разработка раздела «Введение»	10
05.04.2023 г.	Разработка раздела «Литературный обзор»	10
19.04.2023 г.	Разработка раздела «Экспериментальная часть»	10
10.05.2023 г.	Разработка разделов «Результаты проведенного исследования (разработки)».	10
24.05.2023 г.	Разработка разделов «Социальная ответственность» и «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	10
01.06.2023 г.	Оформление ВКР	10
15.06.2023 г.	Представление ВКР	40

**СОСТАВИЛ:**

**Руководитель ВКР**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		15.03.2023

**СОГЛАСОВАНО:**

**Руководитель ООП**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Романенко С.В.	д.х.н.		15.03.2023

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Фоминых Анастасия Сергеевна		01.03.2023

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА  
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И  
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>
9ДМ11	Фоминых Анастасии Сергеевне

<b>Школа</b>	<b>ИШХБМТ</b>	<b>Отделение школы (НОЦ)</b>	<b>ИШХБМТ</b>
<b>Уровень образования</b>	Магистратура	<b>Направление/специальность</b>	18.04.01 Химическая технология

**Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:**

1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	<i>Затраты на сырье, материалы, комплектующие изделия, специальное оборудование, основную и дополнительную заработную плату исполнителей, отчисления на социальные нужды, накладные расходы</i>
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	1. <i>ГОСТ 31532-2012. Энергосбережение. Энергетическая эффективность. Основные положения;</i> 2. <i>ГОСТ 14.322-83. Нормирование расхода материалов. Основные положения;</i> 3. <i>ГОСТ Р 53692-2009 «Ресурсосбережение. Обращение с отходами. Этапы технологического цикла отходов.</i>
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	1. <i>Налоговый кодекс Российской Федерации</i> 2. <i>Федеральный закон от 24.07.2009 N 212-ФЗ (ред. от 19.12.2016, с изм. от 31.10.2019)</i>

**Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:**

1. <i>Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ</i>	<i>Определение потенциальных потребителей результатов исследования, анализ конкурентных технических решений.</i>
2. <i>Разработка устава научно-технического проекта</i>	<i>Планирование этапов разработки программы, определение трудоемкости.</i>
3. <i>Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок</i>	<i>Сравнительный анализ интегральных показателей эффективности, формирование бюджета НТИ</i>
4. <i>Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности</i>	<i>Расчет уравнений эффективности НТИ. Расчет уравнений сравнительной эффективности НТИ.</i>

**Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):**

<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>«Портрет» потребителя результатов НТИ</i></li> <li>2. <i>Сегментирование рынка</i></li> <li>3. <i>Оценка конкурентоспособности технических решений</i></li> <li>4. <i>Причинно-следственная диаграмма Исикавы</i></li> <li>5. <i>Матрица SWOT</i></li> <li>6. <i>График проведения и бюджет НТИ</i></li> <li>7. <i>Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НТИ</i></li> </ol>
---

<b>Дата выдачи задания для раздела по линейному графику</b>	01.03.2023
---	------------

**Задание выдал консультант:**

<b>Должность</b>	<b>ФИО</b>	<b>Ученая степень, звание</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
доцент ОСГН	Маланина Вероника Анатольевна	к.э.н.		01.03.2023

**Задание принял к исполнению студент:**

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
9ДМ11	Фоминых Анастасия Сергеевна		01.03.2023

## ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>
9ДМ11	Фоминых Анастасия Сергеевна

<b>Школа</b>	<b>ИШХБМТ</b>	<b>Отделение (НОЦ)</b>	<b>ИШХБМТ</b>
<b>Уровень образования</b>	Магистратура	<b>Направление/специальность</b>	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Исследование *in vitro* нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе варианта DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C и технеция 99м

**Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:**

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика) и области его применения</li> <li>- Описание рабочей зоны (рабочего места) при разработке проектного решения/эксплуатации</li> </ul>	<p><i>Объект исследования:</i> радиотрейсер DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C, конъюгированный с изотопом технеция 99м.</p> <p><i>Область применения:</i> научно-исследовательские работы, фармацевтическая промышленность, таргетная терапия, неинвазивная диагностика злокачественных образований в онкологии.</p> <p><i>Рабочая зона:</i> лаборатория клеточных исследований ТПУ, научный парк, 204 аудитория.</p> <p><i>Размеры помещения:</i> 5 × 3 м.</p> <p><i>Количество и наименование оборудования рабочей зоны:</i> мешалка магнитная с электронагревом, автоклав паровой медицинский, СО<sub>2</sub>-инкубатор 2 шт., бокс биологической безопасности II класса 2 шт., центрифуга лабораторная настольная.</p> <p><i>Рабочие процессы, связанные с объектом исследования, осуществляемые в рабочей зоне:</i> культивирование эукариотических клеток, клеточные испытания, приготовление рабочих растворов и питательных сред.</p>
--	---

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<p><b>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности при эксплуатации:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;</li> <li>- организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 19.12.2022, с изм. от 11.04.2023)</li> <li>- ГОСТ 12.0.003-2015 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация;</li> <li>- ГОСТ 12.1.003-2014 Система стандартов безопасности труда. Шум. Общие требования безопасности;</li> <li>- СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95*;</li> <li>- СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания";</li> <li>- СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03 Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов (с изм. от 28.02.2022);</li> <li>- ГОСТ Р 22.0.01-2016 Безопасность в чрезвычайных ситуациях;</li> <li>- СП 12.13130.2009 Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности;</li> <li>- N 123-ФЗ от 22.07.2008 (ред. от 30.04.2021) "Технический регламент о требованиях пожарной безопасности";</li> <li>- СанПиН 2.6.1.2523-09 Нормы радиационной безопасности;</li> <li>- специальная должностная инструкция работника</li> </ul>
<p><b>2. Производственная</b></p>	<p>Опасные факторы:</p>

<p><b>безопасность при эксплуатации:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Анализ выявленных вредных и опасных факторов</li> <li>- Расчет уровня опасного или вредного производственного фактора</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Вещества, обладающие острой токсичностью по воздействию на организм (ядовитые вещества/химикаты/химическая продукция);</li> <li>2. Вещества, вызывающие поражение (некроз/омертвление или раздражение) кожи;</li> <li>3. Факторы, связанные с чрезмерно высокой или низкой температурой материальных объектов производственной среды, могущих вызвать ожоги (обморожения) тканей организма человека;</li> <li>4. Электрический ток, вызываемым разницей электрических потенциалов, под действие которого попадает работающий (короткое замыкание);</li> <li>5. Электромагнитные поля, неионизирующие ткани тела человека постоянного характера, связанные с повышенным образованием электростатических зарядов (статическое электричество);</li> <li>- Электромагнитные поля, неионизирующие ткани тела человека переменного характера, связанные с наличием электромагнитных полей промышленных частот (порядка 50 – 60 Гц).</li> <li>6. Движущиеся элементы оборудования общелабораторной центрифуги с высокой скоростью вращения (до 15 000 об/мин).</li> </ol> <p><b>Вредные факторы:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Канцерогенные вещества;</li> <li>2. Монотонность труда, вызывающая монотонию;</li> <li>3. Число производственных объектов одновременного наблюдения;</li> <li>4. Нервно-психические перегрузки, связанные с напряженностью трудового процесса;</li> <li>5. Повышенный уровень шума и ультразвуковых колебаний (воздушного и контактного ультразвука);</li> <li>6. Механические колебания твердых тел и их поверхностей, характеризующиеся повышенным уровнем локальной вибрации;</li> <li>7. Аномальные микроклиматические параметры воздушной среды на местонахождении работающего;</li> <li>8. Отсутствие или недостаток необходимого естественного и искусственного освещения;</li> <li>9. Неионизирующие излучения, такие как инфракрасное и ультрафиолетовое излучение;</li> <li>10. Ионизирующее гамма-излучение.</li> </ol> <p><b>Требуемые средства коллективной и индивидуальной защиты от выявленных факторов:</b> использование специальной одежды (халаты), перчатки (нитриловые нестерильные, латексные опудренные и резиновые), защитные очки, респираторы, свинцовые фартуки, свинцовые перчатки, бахилы, шапочки медицинские одноразовые, свинцовые контейнеры для транспортировки и хранения радиоактивных реактивов.</p> <p><b>Расчёт:</b> система искусственного освещения.</p>
<p><b>3. Экологическая безопасность при эксплуатации:</b></p>	<p>Воздействие на селитебную зону: проникновение токсических веществ в атмосферу и почву при аварийных ситуациях;</p> <p>Воздействие на гидросферу: загрязнение бытовых стоков в результате удаления реагентов в хозяйственно-бытовую канализацию; радиационное загрязнение окружающей среды в результате удаления радиоактивных реактивов в хозяйственно-бытовую канализацию;</p> <p>Воздействие на атмосферу: попадание в атмосферу летучих токсичных веществ;</p> <p>Воздействие на литосферу: загрязнение литосферы вследствие утилизации одноразовых материалов, содержащих токсические вещества, а также при нарушении целостности отработанных люминесцентных ламп; твёрдые бытовые отходы, макулатура.</p>
<p><b>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях при</b></p>	<p><b>Возможные ЧС:</b></p> <p>Биолого-социального и социального характера: инфекционные</p>

<b>эксплуатации:</b>	заболевания людей, массовые беспорядки; Военного характера: последствия введения боевых действий. Природного характера: метеорологические опасные явления; Техногенного характера: пожары, обрушения зданий, аварии на тепловых сетях (системах горячего водоснабжения) в холодное время года; <b>Наиболее типичная ЧС:</b> Метеорологические опасные явления.
----------------------	---

<b>Дата выдачи задания для раздела по линейному графику</b>	01.03.2023
---	------------

**Задание выдал консультант:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Авдеева Ирина Ивановна	-		

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Фоминых Анастасия Сергеевна		

## Реферат

Выпускная квалификационная работа 116 с., 18 рис., 22 табл., 81 источник, 1 прил.

Ключевые слова: неинвазивная радиоизотопная диагностика, альтернативные каркасные белки, технеций-99м, раковые клетки, *in vitro*.

Объектом исследования является радиотрейсер  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C.

Цель работы – исследование *in vitro* нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C и технеция-99м.

В процессе исследования были осуществлено радиомечение DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C изотопом технеций-99м, проведены испытания  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C на культурах раковых клеток и оценены специфичность связывания данного конъюгата с биологической мишенью HER2, клеточный процессинг и интернализация, равновесная константа диссоциации и аффинность к HER2.

В результате исследования было установлено, что  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C отвечает всем требованиям *in vitro* для радиофармацевтических препаратов, что делает данный вариант DARPins перспективным для дальнейших исследований *in vivo*.

Область применения: неинвазивная радиоизотопная диагностика в онкологии.

Экономическая значимость работы: работа может быть использована для осуществления дальнейших испытаний на животных и в перспективе внедрена в качестве метода диагностики онкологических заболеваний.

## Список сокращений и обозначений

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа

ERBB – семейство рецепторных тирозинкиназ эпидермального фактора роста человека

PBS – фосфатно-солевой буфер

RTK – рецепторные тирозинкиназы

МкАТ – моноклональные антитела

ИТК – ингибиторы тирозинкиназы

$^{99m}\text{Tc}$  – радиоизотоп технеций-99m

## Оглавление

Введение.....	15
1 Литературный обзор .....	18
1.1 Рецепторные тирозинкиназы .....	18
1.1.1 Рецепторная тирозинкиназа семейства белков эпидермального фактор роста человека HER2 .....	21
1.1.2 Существующие HER2-таргетные методы лечения онкологий ...	23
1.2 Преимущества альтернативных каркасных белков.....	25
1.2.1 Сконструированные белки с анкиринованными повторами DARPs.....	26
1.3 Технеций-99m как оптимальный радиоизотоп для радиоизотопной диагностики .....	30
2 Экспериментальная часть.....	33
2.1 Материалы и методы .....	33
2.2 Радиомечение .....	34
2.3 Оценка специфичности связывания с рецепторами HER2.....	35
2.4 Оценка клеточного процессинга и интернализации .....	36
2.5 Определение равновесной константы диссоциации .....	37
3 Результаты исследования .....	39
3.1 Радиомечение .....	41
3.2 Результаты испытания по оценке специфичности связывания с рецепторами.....	42
3.3 Результаты испытания по оценке клеточного процессинга и интернализации .....	43
3.4 Результаты испытания по оценке равновесной константы диссоциации.....	44
4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	46
4.1 Предпроектный анализ.....	46
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования .....	46
4.1.2 Анализ конкурентных технических решений.....	47

4.1.3	Диаграмма Исикавы.....	49
4.1.4	SWOT-анализ.....	50
4.2	Планирование научно-исследовательских работ .....	52
4.2.1	Структура работ в рамках научного исследования .....	52
4.2.2	Определение трудоемкости выполнения работ.....	53
4.2.3	Разработка графика проведения научного исследования.....	54
4.2.4	Бюджет научно-технического исследования (НТИ) .....	58
4.3	Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	64
4.3.1	Интегральный финансовый показатель.....	64
5	Социальная ответственность .....	68
5.1	Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности ..	68
5.2	Производственная безопасность .....	69
5.2.1	Анализ выявленных вредных факторов.....	69
5.2.2	Контакт с токсичными химическими веществами.....	71
5.2.3	Контакт с чрезмерно нагретыми или охлаждёнными поверхностями.....	72
5.2.4	Короткое замыкание.....	73
5.2.5	Статическое электричество.....	74
5.2.6	Действие электрического тока.....	75
5.2.7	Вещества, вызывающие поражение (некроз/омертвление или раздражение) кожи.....	75
5.2.8	Контакт с канцерогенными химическими веществами.....	75
5.2.9	Предотвращение возникновения состояния монотонии.....	75
5.2.10	Большое число объектов одновременного наблюдения.....	76
5.2.11	Нервно-психологические перегрузки.....	76
5.2.12	Повышенный уровень шума и ультразвуковых колебаний (воздушного и контактного ультразвука).....	77
5.2.13	Механические колебания твердых тел и их поверхностей, характеризуемые повышенным уровнем локальной вибрации.....	78

5.2.14 Аномальные микроклиматические параметры воздушной среды на местонахождении работающего: температура и относительная влажность воздуха, а также тепловое излучение окружающих поверхностей.....	78
5.2.15 Недостаточный уровень освещённости рабочей зоны.....	79
5.2.16 Неионизирующие излучения.....	82
5.2.17 Ионизирующее гамма-излучение.....	83
5.2.18 Движущиеся элементы оборудования.....	84
5.3 Экологическая безопасность.....	84
5.3.1 Селитебная зона.....	84
5.3.2 Атмосфера.....	85
5.3.3 Гидросфера.....	85
5.3.4 Литосфера.....	85
5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	86
Заключение.....	89
Список публикаций студента.....	90
Библиографический список.....	91
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	103

## Введение

Канцерогенез многих видов рака тесно связан с избыточной экспрессией некоторых рецепторных тирозинкиназ. Ярким примером таких тирозинкиназ является рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2), мутации и сверхэкспрессия которого наблюдаются во многих случаях раковых заболеваний, и наиболее часто встречается при диагностировании рака молочной железы, рака желудка, рака яичников и др.

Для применения и дальнейшего развития таких методов терапии, как терапии с использованием моноклональных антител, конъюгатов антитело-лекарственное средство и ингибиторов тирозинкиназы, необходимо предварительно оценить уровень экспрессии HER2 с высокой точностью.

Основной проблемой при использовании таких терапевтических средств, нацеленных на HER2, является гетерогенность экспрессии HER2 в злокачественных опухолях. Обычные методы определения экспрессии HER2 основаны на биопсии. Однако метод биопсии имеет ряд недостатков, в частности, инвазивный тип метода, возможные осложнения в виде инфекций, затруднения с определением локализации очага поражения в случаях невозможности их пальпации, необходимость применения анестезии. Кроме того, методики, основанные на биопсии, являются неоптимальными для выявления изменения уровня амплификации HER2, что происходит примерно в 20% случаев неoadьювантной терапии.

Неинвазивная радионуклидная молекулярная визуализация экспрессии HER2 является перспективным методом определения уровня экспрессии данного онкомаркера, лишённым недостатков инвазивных методов[1-3].

Сравнение доклинических [4] и некоторых клинических [3] данных позволяет предположить, что наиболее перспективными типами зондов являются сконструированные каркасные белки (скаффолды). По сравнению с другими целевыми агентами, каркасные белки обеспечивают более короткое время между инъекциями и визуализацией HER2. Кроме того, они

обеспечивают более высокую контрастность изображения, чем, например, меченые антитела, что создает потенциал для более высокой чувствительности визуализирующей диагностики.

В настоящее время среди скаффолдов для радионуклидной молекулярной визуализации экспрессии HER2 наибольший интерес вызывают белки дарпины (DARPin). Для дарпинов характерна сравнительно небольшая молекулярная масса (14 – 18 кДа), высокая аффинность к рецепторам HER2, а также способность эффективно и специфично накапливаться в опухолях и быстро выводиться из здоровых тканей, что делает их перспективным вариантом для использования в радионуклидной диагностике.

В медицине одним из наиболее широко используемых радионуклидов является изомер изотопа технеция-99 – технеций-99m. К его преимуществам относится короткий период полураспада (6 ч), эффективный синтез из генераторов технеция, а также возможность конъюгации с белками с высокой чистотой (более 90%), что делает актуальным исследование новых радиотрейсеров на основе  $^{99m}\text{Tc}$  и различных вариантов DARPin.

Целью данной работы являлось исследование *in vitro* нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C и технеция-99m.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

– культивировать клетки линий SKOV-3, SK-BR-3, PC-3 для осуществления испытаний по определению специфичности связывания  $^{99m}\text{Tc}$  DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C с рецепторами HER2, клеточного процессинга и интернализации  $^{99m}\text{Tc}$  DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C клетками линии SKOV-3, а также насыщения рецепторов клеток линии SKOV-3 для установления равновесной константы диссоциации;

– осуществить испытания по определению специфичности связывания  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C с рецепторами HER2 на клеточных линиях SKOV-3, SK-BR-3, PC-3;

– осуществить испытания по оценке клеточного процессинга и интернализации  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C клетками линии SKOV-3;

– осуществить испытания по определению насыщения рецепторов клеток линии SKOV-3 для установления равновесной константы диссоциации;

Дипломная работа включает в себя введение, литературный обзор, экспериментальную часть, обсуждение результатов, заключение, финансовый менеджмент, социальную ответственность, библиографический список и приложение.

Дипломная работа написана на 116 страницах, список используемых источников включает 81 публикацию отечественных и зарубежных авторов.

Литературный обзор посвящен рассмотрению семейства ERBB рецепторных тирозинкиназ, в частности, ErbB-2, а также альтернативных каркасных белков дарпинов.

В экспериментальной части описаны методики проведения мечения, а также клеточных испытаний на раковых клетках исследуемого дарпина  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C.

В результатах исследования обсуждены полученные в ходе испытаний результаты.

По итогам проделанной работы сформулировано заключение.

## 1 Литературный обзор

### 1.1 Рецепторные тирозинкиназы

Изучение процесса канцерогенеза играет критически важную роль для понимания природы зарождения и развития опухолей, а также для поиска новых и эффективных методов лечения онкологических заболеваний. Показано, что рецепторные тирозинкиназы (РТК) (рис. 1), являющиеся метаботропными клеточными рецепторами, выполняют не только ключевую функцию в регуляции нормальных клеточных процессов, но и играют критическую роль в зарождении и развитии злокачественных опухолей. Мутации в РТК приводят к активации каскада реакций, оказывающих множество различных воздействий на экспрессию белка.

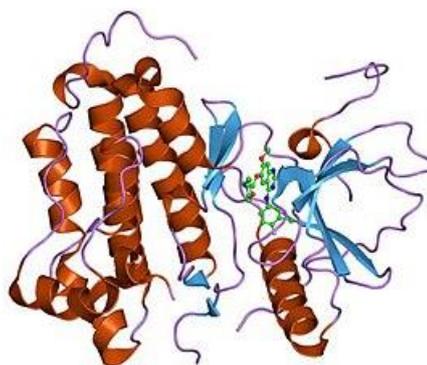


Рисунок 1 – Общее строение рецепторных тирозинкиназ

Участие РТК в нарушениях функционирования клеток, приводящих к образованию рака, фиброзов, дегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний, сделало рецепторные тирозинкиназы привлекательной мишенью для медикаментозного лечения таких заболеваний. К примеру, моноклональное антитело трастузумаб (рис. 2), являющееся действующим веществом препарата герцептин, способно связываться с внеклеточным доменом рецепторной тирозинкиназы HER2, ингибируя нижестоящие сигнальные пути и тем самым блокируя пролиферацию опухолевых клеток человека с гиперэкспрессией HER2.

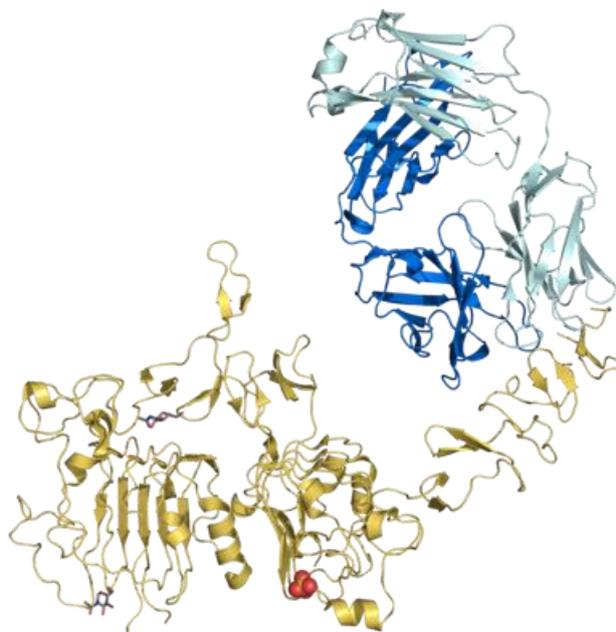


Рисунок 2 – Трастузумаб (синий), связанный с HER2 (золотой)

Рецепторные тирозинкиназы включают в себя множество семейств, таких как семейство рецепторов факторов роста фибробластов (FGFR), семейство рецепторов факторов роста эндотелия сосудов (VEGFR) и т.д.

Первыми открытыми RTK стало семейство белков эпидермального фактора роста человека ERBB. Данное семейство включает в себя четыре различных рецепторных тирозинкиназы: HER1 (EGFR1, ErbB-1), HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3), HER4 (ErbB-4) (рис. 3) – сходных по структуре и последовательности гликопротеинов, ассоциированных с поверхностью мембран клеток эпителиального и мезенхимального происхождения. Каждый из данных белков содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен тирозинкиназы [5, 6]. Для семейства ERBB известно 11 внеклеточных лигандов, специфичных к рецепторам эпидермального фактора роста, за исключением HER2 – на данный момент не известно ни одного лиганда, способного напрямую связываться с HER2. Связывание лиганда с внеклеточным доменом ErbB приводит к димеризации (гомо- или гетеро-) ErbB с другими рецепторами семейства в различных комбинациях, что индуцирует аутофосфорилирование внутриклеточного домена тирозинкиназы.

Фосфорилированные остатки служат сайтами связывания для адаптерных и каркасных белков, активирующих множество нижестоящих сигнальных путей, к примеру, PI3K/АКТ – одного из универсальных внутриклеточных сигнальных путей клеток человека, который отвечает за рост, метаболизм, клеточную пролиферацию, а также уход от апоптоза, – и другие пути, такие как Ras/MEK/ERK, PLC $\gamma$ /PKC и JAK/STAT. Сигнальные пути, активируемые семейством ERBB, ответственны за регуляцию выживаемости клеток, дифференцировку, пролиферацию, инвазию, адгезию и другие процессы. Помимо этого, известна роль этих путей в усилении экспрессии генов, которые активируют эпителиально-мезенхимальный переход – ключевой процесс миграции и инвазии раковых клеток, приводящий к образованию метастазов [7]. Эффективность и исход активированных сигнальных каскадов определяются специфическими лигандами, димерными комплексами ERBB и белками, которые связаны с фосфорилированными остатками тирозина в С-концевом хвосте рецепторов ERBB [8].

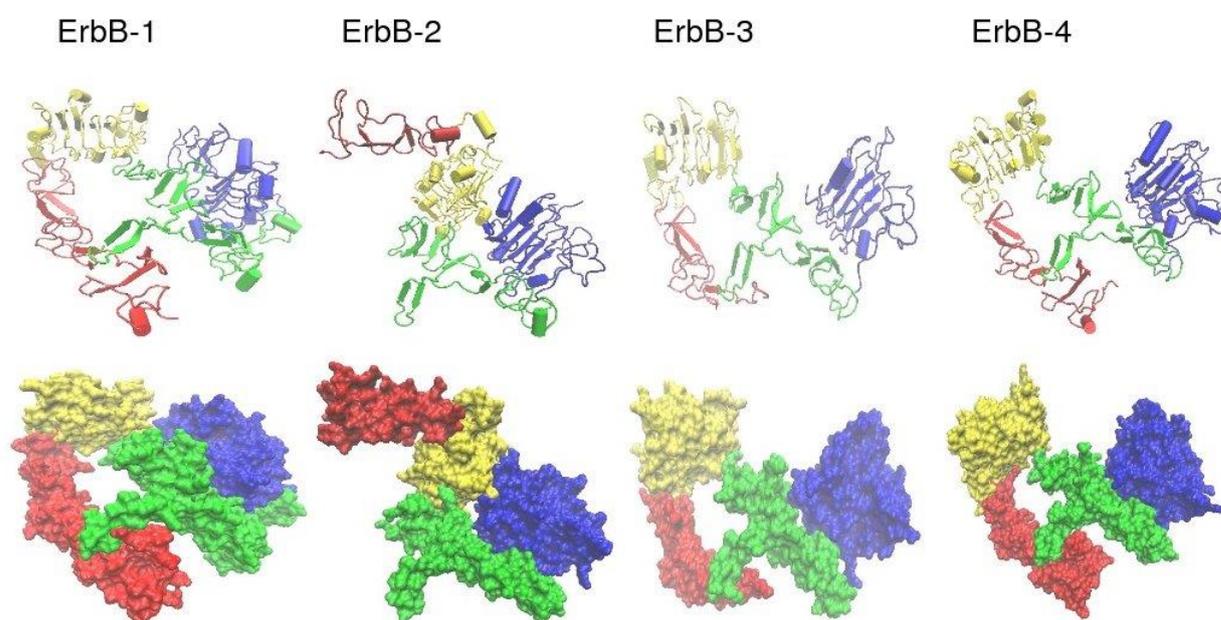


Рисунок 3 – Трехмерная структура белков ErbB

Нарушения в передаче сигналов ERBB связаны с возникновением различных заболеваний. Так, в случае недостаточной передачи наблюдается развитие нейродегенеративных заболеваний, таких как рассеянный склероз и

болезнь Альцгеймера. При избыточной передаче отмечается развитие широкого спектра злокачественных образований. ErbB-1 и ErbB-2 обнаруживаются во многих случаях раковых заболеваний человека.

### **1.1.1. Рецепторная тирозинкиназа семейства белков эпидермального фактор роста человека HER2**

В последние годы одним из важнейших биомаркеров и терапевтических мишеней стала рецепторная тирозинкиназа ErbB-2, или HER2 (рис. 4).

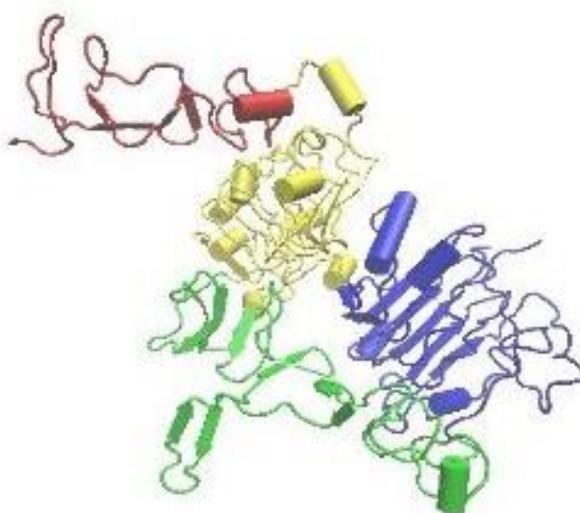


Рисунок 4 – Структура рецепторной тирозинкиназы HER2

У людей белок ErbB-2 кодируется геном ERBB – протоонкогеном, расположенном на длинном плече 17-й хромосомы человека (17q12). В случае развития опухолей в структуре гена HER2 зачастую обнаруживаются точечные мутации, которые влияют как на внеклеточный, так и на трансмембранный участки HER2, активируя этот рецептор независимо от лиганда. К примеру, замена валина на глутамин или глутаминовую кислоту в трансмембранном домене может привести к димеризации HER2. Частота встречаемости мутаций ERBB в различных видах опухолей неодинакова. Наиболее часто такие мутации встречаются при немелкоклеточном раке легких (10 – 35 %) и при раке мочевого пузыря (10 %), также имеются данные о мутациях ERBB при диагностировании рака молочной железы,

желудка и эндометрия, и почти всегда эти мутации идентифицируют при отсутствии амплификации ERBB.

Амплификация ERBB наблюдается в 15 – 30% случаев рака молочной железы. Помимо рака молочной железы, гиперэкспрессия встречается при агрессивных формах рака матки, при аденокарциномах желудка (7 – 34 %), легкого, яичников, а также в 30 % случаев карцином слюнных желез, что доказывает участие HER2 в онкогенезе.

Главным отличием HER2 от других рецепторов семейства ERBB является то, что он не связывается напрямую ни с одним известным на данный момент лигандом. Роль лигандов для связывания с HER2 в HER2-опосредованной активации сигнальных путей играют другие рецепторы ERBB, приводящие к гетеродимеризации, либо же активация происходит посредством гомодимеризации с другими рецепторами HER2 в случае их высокой концентрации на мембране клеток, что происходит, например, при раковых заболеваниях [9, 10]. Активированный другими членами ERBB HER2 инициирует нижестоящие каскады реакций, аналогичные EGFR.

Наиболее предпочтительным партнером для димеризации HER2 является ErbB-3, или HER3. Среди всех пар ERBB гетеродимер HER2/ERBB3 является наиболее мощным активатором сигнального каскада PI3K/АКТ посредством связывания субъединицы p85 PI3K с ERBB3 [11]. Кроме того, ERBB3 последовательно фосфорилируется в тканях рака молочной железы человека, вызванных амплификацией HER2 [12]. Подавление ERBB3 ингибирует жизнеспособность клеток рака молочной железы, сверхэкспрессирующих HER2: было показано, что ERBB3-экспрессирующие ксенографты с амплификацией HER2 претерпевают быструю регрессию [12]. Аналогичным образом, нейтрализующее ERBB3 антитело также эффективно снижало рост ксенографтов рака молочной железы человека с амплификацией HER2 [13]. Все эти результаты указывают на существенную роль ERBB3 в HER2-опосредованной онкогенной передаче сигналов.

В [14] было охарактеризовано 13 мутаций HER2 при раке молочной железы, не зависящем от амплификации гена HER2, в результате чего было обнаружено, что некоторые из них чувствительны к HER2-таргетной терапии. Эти данные предоставили критические доклинические результаты, позволяющие предположить, что для лечения пациенток с раком молочной железы с мутациями HER2 возможно применение существующих HER2-таргетных препаратов [14].

### **1.1.2 Существующие HER2-таргетные методы лечения онкологий**

На данный момент Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (США) было одобрено или переведено в клинические испытания несколько HER2-таргетных методов лечения рака молочной железы, среди которых – терапевтические средства на основе моноклональных антител (мкАТ), например, трастузумаб (Герцептин®), пертузумаб (Перьета®) и трастузумаб эмтанзин (Кадсила®), а также ингибиторы тирозинкиназы (ИТК), например, лапатиниб (Тайкерб®) и нератиниб (в клинических испытаниях) [15].

Рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело трастузумаб (герцептин), которое нацелено на внеклеточный домен HER2, было первой таргетной терапией, одобренной Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств в 1998 году для лечения рака молочной железы [16]. Пертузумаб предотвращает димеризацию HER2 другими рецепторами ERBB/HER, в частности наиболее мощным сигнальным гетеродимом HER2/HER3 [17]. Трастузумаб эмтанзин (Т-DM1) представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, который сочетает трастузумаб и цитотоксический агент эмтанзин, ингибирующий микротрубочки [18]. Лапатинаб является обратимым АТФ-конкурентным ингибитором тирозинкиназы против EGFR и HER2, тогда как нератиниб является необратимым АТФ-конкурентным ингибитором рецепторных тирозинкиназ ERBB, EGFR, HER2 и ERBB4 [19, 20].

Трастузумаб, который считается стандартом лечения пациентов с ранним и метастатическим раком молочной железы, сопровождающимся избыточной экспрессией HER2, ингибирует расщепление эктодомена HER2, блокирует лиганднезависимые HER2-содержащие димеры, активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность и индуцирует интернализацию и деградацию HER2 [21, 22].

Хотя трастузумаб значительно улучшил исход у пациентов с раком молочной железы, также наблюдалась резистентность к трастузумабу. Было показано, что несколько механизмов способствуют устойчивости к трастузумабу. Среди них выделяют:

1. Конститутивную активацию нижестоящего пути PI3K из-за инактивации или потери опухолевого супрессора фосфатазы и гомолога тензина (PTEN) или мутаций в гене PI3KCA [23, 24];
2. Активацию Src-киназы, обусловленную дефицитом PTEN [25];
3. Сверхэкспрессию других RTK, например, других рецепторов семейства EGFR, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, рецептор фактора роста гепатоцитов (с-Met) и эфриновый рецептор EphA2 [26-29];
4. Внутренние изменения HER2, например альтернативная инициация трансляции, варианты сплайсинга и мутации;
5. Протеолитическое выделение полноразмерного HER2, которое генерирует укороченную форму HER (p95HER2), лишенную домена, связывающего трастузумаб [30].

Другим потенциальным механизмом устойчивости к трастузумабу является связывание муцина-4 с внеклеточным доменом HER2, который маскирует сайт связывания трастузумаба на HER2 [31]. Другие механизмы, способствующие устойчивости к трастузумабу, включают дефекты в механизме апоптоза, повышенные уровни ингибитора белка апоптоза, сурвивина и изменения в контроле клеточного цикла [15]. Для борьбы с

резистентностью в клинических испытаниях оценивались различные комбинированные методы лечения, включая комбинации мкАТ и ИТК [15].

## **1.2 Преимущества альтернативных каркасных белков**

В настоящее время одним из основных методов терапии онкологических заболеваний являются методы с использованием моноклональных антител (ммкАТтАК). На данный момент на рынке представлен ряд препаратов, успешно использующихся в лечении онкологий либо находящихся на стадии клинических испытаний. Такой успех в использовании мкАТ обусловлен тем, что мкАТ могут быть выбраны для связывания практически с любой заданной мишенью с высоким сродством и специфичностью, тем самым проявляя нейтрализующие или цитотоксические функции с очень ограниченными побочными эффектами [32, 33]. Однако мкАТ не лишены ряда серьезных недостатков: их крупный размер и высокая молекулярная масса сильно снижают проникновение как в нормальные ткани, так и в солидные опухоли; необходимость наработки в клетках млекопитающих приводит к высокой стоимости производства; наличие константной части антител может приводить к нежелательным эффектам, в частности, к их токсичности и увеличению времени циркуляции в крови [34-36].

Примером таких препаратов на основе антител является запатентованный и широко используемый в лечении рака молочной железы и рака желудка препарат трастузумаб, известный под торговой маркой Герцептин®. Несмотря на явные преимущества препарата, а именно увеличение выживаемости пациентов как на ранних, так и на поздних стадиях онкологических заболеваний, а также снижение риска рецидива, стоимость трастузумаба достаточно велика, помимо этого, он имеет ряд серьезных побочных эффектов, к которым относятся, в частности, сердечная недостаточность и заболевания легких. Кроме того, как было описано выше, у части пациентов наблюдается резистентность к трастузумабу, что встречается в 15 – 25 % случаев.

Благодаря разработке технологий селекции *in vitro*, таких как фаговый дисплей, рибосомный дисплей и дрожжевой дисплей, связывающих генотип (последовательность гена белка) и фенотип (способность связываться с мишенью), стало возможно подбирать специфические связующие вещества без участия иммунизации. Это положило начало разработке различных альтернативных каркасных белков, способных преодолеть недостатки мКАТ. Такие белки имеют постоянную «каркасную» часть и переменные участки, аминокислотную последовательность которых можно изменять без изменения пространственной структуры всего белка [37]. Альтернативные каркасные белки имеют ряд преимуществ перед антителами: низкая молекулярная масса позволяет им быстро и эффективно проникать в ткани и так же быстро выводиться из здоровых тканей, специфически накапливаясь в опухолях, отсутствие константной части антител нивелирует цитотоксические эффекты, высокая стабильность позволяет хранить их при комнатной температуре без потери активности, а легкость наработки в микроорганизмах значительно снижает стоимость их производства. Примерами таких белков могут служить аффибоды, монободы, антикалины и дарпины.

### **1.2.1 Сконструированные белки с анкириновыми повторами DARPin**

DARPin, или дарпины – *designed ankyrin repeat proteins* – это сконструированные каркасные белки с анкириновыми повторами. Каркас дарпинов состоит из природных белков анкиринов – семейства белков, которые отвечают за клеточную сигнализацию, регуляцию и структурную целостность клетки. Как правило, дарпины состоят из 4-5 повторов, из которых первый (N-концевой мотив) и последний (C-концевой мотив) экранируют гидрофобное ядро белка от водной среды (т.н. кэппирующие повторы). Каждый мотив состоит из 33 аминокислот и включает  $\beta$ -складку и две антипараллельные  $\alpha$ -спирали (рис. 5). В аминокислотной последовательности каркасной части дарпинов отсутствуют цистеин (чтобы

избежать образования дисульфидных связей), глицин и пролин (так как некоторые аминокислоты входят в состав  $\alpha$ -спирали). Отсутствие цистеинов в каркасе молекулы позволяет увеличивать сайт-специфическое связывание путем добавления сайт-специфических цистеинов в концевые мотивы белка. С этой же целью в состав концевых мотивов можно вводить и непротеиногенные аминокислоты [38].

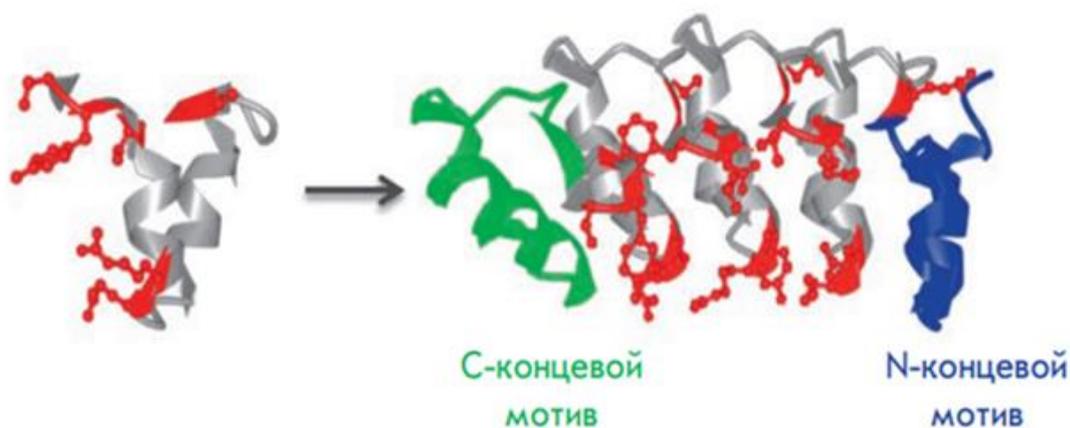


Рисунок 5 – Общее строение дарпина с пятью мотивами

Для создания стабильной третичной структуры необходимо минимум три повтора, т.е. один внутренний повтор и два кэспирующие.

Молекулярная масса большинства дарпинов находится в пределах 14 – 18 кДа, для них характерна достаточно высокая для белковых молекул термостабильность (температура плавления может достигать 90 °С), а также устойчивость к протеазам и денатурирующим агентам. Высокая активность и аффинность делает дарпины активными в низких концентрациях, что, в сочетании с радионуклидами для диагностики раковых заболеваний, позволяет снизить дозовую нагрузку на пациента и медицинский персонал.

Дарпины экспрессируются в цитоплазме *Escherichia coli* с высоким выходом (более 10 г/л при ферментации, 1 г/л в колбе) в растворимой форме.

Принцип создания дарпинов позволяет модифицировать белки с целью обеспечить специфичность к определенным биологическим мишеням. Благодаря этому были созданы дарпины, связывающиеся с различными молекулами, к примеру, с молекулами, вовлеченными в онкогенез: ЕрСАМ

[39], EGFR [40], VEGF, HGF [41], катепсином В [42], KRAS [43] и др. Высокая специфичность и аффинность к выбранным биологическим мишеням позволяет использовать дарпины в качестве зондов для доставки наночастиц, в адресной фотодинамической терапии, в диагностике раковых заболеваний, а также для создания онколитических вирусов и химерных антигенных рецепторов.

Известно, что дарпины можно успешно конъюгировать с радионуклидами с высокой радиохимической чистотой и выходом, что делает их перспективными агентами для неинвазивной радионуклидной диагностики. К примеру, в исследованиях [44, 45] молекулы дарпина 9\_29, меченных  $^{99m}\text{Tc}$  и  $^{125}\text{I}$ , продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность соединений к рецепторам Her2/неу, как в случае *in vitro*, так и в *in vivo*.

Первоначальная разработка зондов для визуализации на основе DARPIn, меченных  $^{99m}\text{Tc}$ , была основана на использовании трикарбонильного ядра технеция ( $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ) в сочетании с хелатором на основе гексагистидинсодержащего пептида (гистидиновые метки или His<sub>6</sub>-метки) [46, 47]. Привлекательной особенностью этого подхода является то, что гистидиновые метки могут быть использованы не только для стабильного мечения белков технецием, но и для их очистки с помощью аффинной хроматографии иммобилизованных ионов металлов после получения рекомбинантов [42]. В то время как эти индикаторы демонстрировали хорошую визуализацию ксенотрансплантатов, экспрессирующих HER2, наблюдалось их высокое накопление в печени. В работе с использованием других каркасных белков, молекул аффибоди, было обнаружено, что замена каждого второго гистидина в His<sub>6</sub>-метке глутаматом приводит к образованию (HE)<sub>3</sub>-метки [48]. Это также позволяет проводить стабильное мечение с использованием ядра  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ , но обеспечивает значительно более низкое поглощение печенью [49]. Оценка этой метки продемонстрировала, что позиционирование на N-конце нацеленного на HER2 DARPIn G3 приводит к

трехкратному снижению поглощения печенью по сравнению с поглощением других вариантов, содержащих His<sub>6</sub>-tag [50]. Этот вариант, обозначенный как [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>-G3 (рис. 6), был оценен в ходе I фазы клинического испытания [51]. Клинические данные продемонстрировали, что инъекции [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>-G3 были безопасны и обеспечивали низкую дозовую нагрузку на пациентов. Визуализация с использованием [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>-G3 позволила различать HER2-положительные и HER2-отрицательные опухоли рака молочной железы.

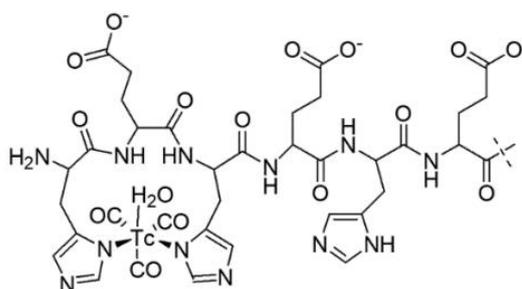


Рисунок 6 – Схематическое изображение комплекса [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>-G3



Рисунок 7 – Положение [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>-G3 на N-конце DARPin G3

Одним из недостатков [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>-G3 для перехода на стадию клинических испытаний является использование двухэтапной процедуры мечения, которая включает преобразование [<sup>99m</sup>Tc]Tc-пертехнетата в [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub><sup>+</sup>-ядро и последующее конъюгирование [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub><sup>+</sup> к целевому DARPin. Другой проблемой является необходимость проведения гель-эксклюзионной хроматографии для очистки меченого [<sup>99m</sup>Tc]Tc-(HE)<sub>3</sub>-G3 от компонентов реакционной смеси. По-видимому, разработка

одноступенчатой процедуры мечения, которая не требовала бы очистки, сделала бы мечение более надежной и упростила бы клиническое внедрение [52]. Опыт в мечении молекул аффибоди и ADAPTs предполагает, что этого можно достигнуть путем использования хелатора на основе цистеинсодержащего пептида, размещенного на С-конце каркасного белка [53-55]. В этом случае хелатор  $SN_3$  образуется тиоловой группой цистеина и амидными азотами аминокислот, расположенными на N-конце (рис. 2). Важно отметить, что выбор аминокислот в таких хелаторах влияет на внутриклеточное удержание  $^{99m}Tc$  после интернализации целевого белка клетками в опухолях и в нормальной ткани. Использование заряженных аминокислот, например глутамата или лизина, приводит к образованию так называемых остаточных меток, то есть обеспечивает сильное внутриклеточное сохранение активности [53]. Они обеспечивают улучшенное внутриклеточное удержание активности раковых клеток, но также увеличивают задержку почками в случае почечной реабсорбции. Кроме того, включение глутаматов снижало поглощение печенью молекул аффибоди, но этот эффект следует сопоставлять с повышенным сохранением внутриклеточной активности в печени. Варианты, содержащие глицин и серин, не накапливались, т.е. они диффундируют из клеток после протеолитической деградации целевых белков в лизосомах

Это позволяет снизить задержку  $^{99m}Tc$  в почках и печени. Таким образом, выбор оптимального хелатора на основе цистеинсодержащего пептида может обеспечить максимально возможное поглощение активности в опухолях и минимально возможное поглощение в нормальных тканях, т.е. улучшить контрастность изображения.

### **1.3 Технеций-99m как оптимальный радиоизотоп для радиоизотопной диагностики**

В настоящее время радиоизотопы широко применяются в медицине. Ядерная медицина потребляет больше половины радиоактивных изотопов, из

которых 46 % используется в кардиологии, 34 % в онкологии и 10 % в неврологии.

В радиоизотопной диагностике широкое применение нашел изотоп технеция технеций-99m. Технеций-99m в составе радиофармацевтических препаратов используется для диагностики с помощью гамма-камер злокачественных образований щитовидной и слюнных желез, мозга, желудка, различных заболеваний сердечно-сосудистой системы, легких, печени и т.д. 94 % технеция-99m, представляющего собой короткоживущий изотоп с периодом полураспада 6 ч, за 24 ч распадается до технеция-99. С учетом его периода полувыведения (24 ч), его использование позволяет быстро проводить процедуры сканирования, при этом, не оказывая на пациента и медицинский персонал высокой дозовой нагрузки. Однако эти же качества делают данный радионуклид непригодным для применения в терапевтических целях [54].

Еще одним достоинством  $^{99m}\text{Tc}$  является его быстрый, эффективный и сравнительно недорогой синтез из генераторов технеция, который происходит согласно схеме, приведенной на рисунке 8. 88 % исходного молибдена-99 претерпевают  $\beta$ -распад до технеция-99m, позволяя получить высокий выход необходимого  $^{99m}\text{Tc}$  без большого количества сопутствующих примесей металлов и других радионуклидов и элементов.

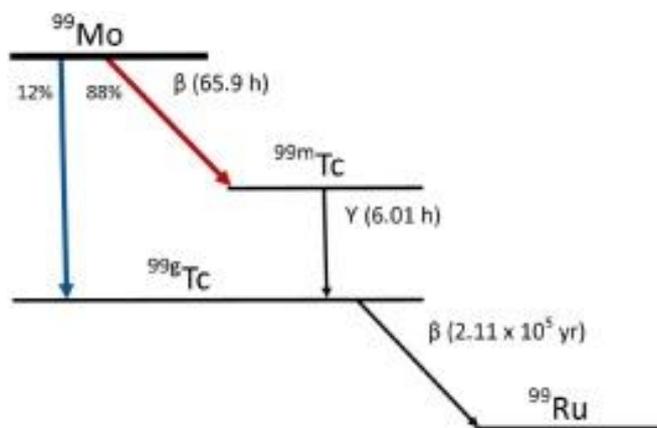


Рисунок 9 – Схема реакции получения  $^{99m}\text{Tc}$  из  $^{99}\text{Mo}$  в генераторах технеция-99m

Помимо достаточно низкой стоимости и эффективного синтеза целевого продукта, исходный радионуклид  $^{99}\text{Mo}$  имеет период полураспада 66 ч, что обеспечивает возможность оперативной доставки генераторов в лечебные учреждения, в т.ч. и на большие расстояния.

Все эти достоинства делают  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ценным и перспективным для применения в медицинских целях, а также для поиска новых методов терапии и диагностики.

## 2 Экспериментальная часть

### 2.1 Материалы и методы

Белок DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub> был продуцирован в *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen-EMD Millipore, Мэдисон, Висконсин, США) как C-концевое расширение малого убиквитин-подобного белка-модификатора SUMO [55].

Молекулярная масса белка была измерена методом ВЭЖХ-МС с электроспрей ионизацией.

Аминокислотная последовательность для DARPin G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C: DLGKLLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNAKDEYGLPLYLATAHGHL-EIVEVLLNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQKLNGGGSGGGSGGGSC.

Рассчитанная молекулярная масса: 14 075,8 Да.

Наборы для производства трикарбонилтехнеция были приобретены в Центре радиофармацевтических наук (Институт Пауля Шеррера, Виллиген, Швейцария).

Чистоту конъюгата после радиомечения измеряли методом тонкослойной хроматографии (iTLC) проводили с использованием пластинок для хроматографии на силикагеле iTLC (Aglient Technologies, Inc., Фолсом, Калифорния, США). Распределение радиоактивности вдоль хроматографической пластинки измеряли с помощью iTLC-сканера miniGITA Single (Elysia Raytest, Штраубенхардт, Германия).

Радиоактивность измеряли с помощью автоматического гамма-спектрометра со сцинтилляционным детектором NaI(Tl) Wizard 1480 (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США).

Пертехнетат технеция-99m, [<sup>99m</sup>Tc]TcO<sub>4</sub>, был получен из коммерческого генератора технеция-99m ГТ-4К (<sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc генератора) (Филиал ФГУП «Научно-исследовательский физико-химической институт им. Л.Я. Карпова», Обнинск, Россия).

Линии раковых клеток с высокой экспрессией HER2 SKOV-3 (карцинома яичников) и SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы), а

также PC-3 (аденокарцинома предстательной железы) с очень низкой экспрессией HER2 были приобретены у Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Клетки культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 с добавлением с добавлением глутамина (GlutaMAX, Gibco, США), 10% фетальной бычьей сыворотки (One Shot™, Thermo Fisher Scientific, Бразилия), антибиотика (пенициллин-стрептомицин, Paneko, Россия) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C. Рост и морфологию клеток контролировали с помощью инвертированного микроскопа (Zeiss Axio Vert A1).

Эксперименты *in vitro* проводились с использованием 35-миллиметровых чашек Петри (обработанная поверхность Nunclon Delta, ThermoFisher Scientific, Роскилле, Дания).

## 2.2 Радиомечение

Сайт-специфическое радиоактивное мечение [<sup>99m</sup>Tc][Tc=O]<sup>+</sup> исследуемого варианта DARPin G3 с использованием цистеинсодержащих хелаторов на основе С-концевых аминокислот было выполнено аналогично методике, описанной ранее Orojjeni et al. [56]. Поскольку белки склонны к спонтанному образованию межмолекулярных дисульфидных связей, для увеличения выхода данный вариант предварительно восстанавливали при помощи дитиотреитола (ДТТ). Раствор ДТТ (150-кратный молярный избыток, 15 мг/мл в дегазированном 0,01 М PBS, pH 7,4) смешивали с DARPin (500 мкг, 2 мг/мл в 0,02 М PBS, pH 7,4) для получения конечной концентрации ДТТ, равной 18 мМ. Полученный раствор инкубировали при температуре 40 °C в течение 60 мин. Последующую очистку восстановленного DARPin от ДТТ проводили методом гель-эксклюзионной хроматографии с использованием колонки NAP-5, уравновешенной и элюированной PBS. Концентрацию очищенного белка во фракциях измеряли с помощью NanoDrop OneC. Для последующих процедур мечения восстановленный DARPin-G3 хранили -20 °C в аликвотах по 75 мкг в 100 мкл PBS каждая.

На этапе процедуры мечения был подготовлен набор, содержащий 75 мг дигидрата хлорида олова (II), 5 мг натриевой соли глюконовой кислоты и 100 мкг ЭДТА. Один лиофилизированный набор восстанавливали в 100 мкл PBS, смешивали с 75 мкг DARPin G3 в 100 мкл PBS и добавляли 100 мкл элюата генератора, содержащего пертехнетат натрия с технецием-99m (150 – 300 МБк). Полученный раствор инкубировали при 60 °С в течение 30 мин. После инкубации радиоактивно меченный белок выделяли с помощью гелексклюзионной хроматографии на колонках NAP-5, предварительно уравновешенной и элюированной PBS, содержащим 20 мкг/мл дигидрата хлорида олова (II). Анализ белка, меченного [<sup>99m</sup>Tc]Tc, проводили методом тонкослойной хроматографии в PBS. В этой системе радиоактивно меченный <sup>99m</sup>Tc DARPin-G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub> и гидролизованный восстановленный технеций (ГВТ) оставались в точке нанесения, а все формы свободных радионуклидов (включая [<sup>99m</sup>Tc]TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> [<sup>99m</sup>Tc]Tc-глюконовую кислоту) мигрировали с фронтом растворителя.

### **2.3 Оценка специфичности связывания с рецепторами HER2**

Испытания проводили на трех клеточных линиях: SKOV-3 (средняя экспрессия HER2), SK-BR-3 (высокая экспрессия), PC-3 (низкая экспрессия), согласно методике [57]. За два дня до эксперимента клетки засеивали в 6-луночные планшеты для культивирования в количестве  $6 \times 10^5$  в лунку.

Концентрация «холодного» раствора DARPin-G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C для блокирования составила 100 нМ, «горячего» с меченым <sup>99m</sup>Tc DARPin-G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C – 1 нМ.

В день эксперимента клетки в лунках промывали культуральной средой, после чего добавляли 0,5 мл блокирующего раствора в три лунки, в другие три лунки добавляли 0,5 мл культуральной среды. Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) в течение 30 минут, чтобы позволить блокирующим молекулам связаться с рецепторами. После инкубации ко всем клеткам добавляли 0,5 мл меченого <sup>99m</sup>Tc DARPin-G3-

$(G_3S)_3C$  до конечного объема 1 мл на лунку. Инкубировали все в течение 1 ч при 37 °C, 5 %  $CO_2$ .

После завершения времени инкубации собирали культуральную среду из всех лунок с клетками в промаркированные пробирки, промывали лунки с клетками PBS, добавляли 0,5 мл раствора трипсина-ЭДТА во все чашки с клетками и инкубировали при 37 °C, 5 %  $CO_2$ , до снятия клеток с поверхности лунок (около 5 – 10 минут). По завершении трипсинизации добавляли 0,5 мл PBS для омывки во все лунки с клетками и собирали суспензию в помеченные пробирки. Активность фракций, содержащих клетки, и фракций, содержащих среду, измеряли на гамма-спектрометре. Эксперимент проводили в трех повторах.

## **2.4 Оценка клеточного процессинга и интернализации**

Клеточный процессинг и интернализацию  $^{99m}Tc$  DARPin-G3- $(G_3S)_3C$  оценивали на клетках линии SKOV-3.

Клетки линии SKOV-3 засеивали за 24 часа в культуральные чашки Петри 35 мм по  $10^6$  клеток на чашку. Испытания проводили по следующим временным точкам: 1, 2, 4, 6 и 24 ч. На каждую точку отводилось 3 чашки.

Из каждой чашки удаляли среду аспиратором. Готовили 1 нМ горячий раствор и добавляли по 1 мл в каждую чашку, после чего инкубировали при 37 °C. Готовили фракционные пробирки, помеченные для сбора среды (M), кислотной фракции (A) и клеток (B) для каждой временной точки и соединения. В указанные временные точки (1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч) собирали инкубационную среду в пробирки (M) и промывали клетки охлажденным до 0 °C PBS, и собирали в эти же пробирки. Далее промывали клетки 1 мл 0,2 М глициновом буфере с 4 М мочевиной pH 2,0, инкубировали кислые растворы в течение 5 мин на льду, повторно промывали клетки 1 мл глициновом буфере и собирали в ту же пробирку (A), согласно методике, использованной ранее для молекул аффибоди [57]. Радиоактивность в этой фракции является мембрано-связанной радиоактивностью. Остатки клеток, содержащих интернализированные

конъюгаты, собирали обработкой чашек 1 мл 1 М раствора NaOH в течение 30 мин при 37 °С. С помощью скребков собирали всю радиоактивную составляющую из лизата. Собирали основные растворы в пробирки (В) и промывали еще 1 мл NaOH (также собранного в ту же пробирку). Радиоактивность в этой фракции является интернализированной радиоактивностью.

Измеряли общую клеточно-связанную, мембрано-связанную и интернализированную активность при помощи гамма-счетчика.

Описанный выше протокол проводили для каждой временной точки.

## **2.5 Определение равновесной константы диссоциации**

Равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) определяли с использованием анализа насыщения. Для каждой концентрации тестируемого белка готовили набор из четырех чашек для культивирования клеток с клетками SKOV-3. Три чашки использовали для определения специфического связывания, и одну чашку для культивирования клеток использовали для определения неспецифического связывания путем блокирования рецепторов.

Клетки в количестве  $10^6$  клеток на чашку были засеяны за день до эксперимента в чашки Петри 35 мм. Непосредственно перед измерениями среду аспирировали, клетки промывали PBS. Для оценки насыщения использовали восемь концентраций меченого белка (в диапазоне от 0,22 до 40 нМ). Рецепторы клеток в каждой контрольной чашке предварительно насыщали 0,5 мл 2000 нМ немеченого белка. В другие чашки добавляли только среду с сывороткой (того же объема), и клетки инкубировали в течение 30 мин (5 %  $CO_2$ , 37 °С). Далее ко всем клеткам добавляли требуемую концентрацию меченого DARPin (4 °С, 0,5 мл на чашку) и клетки инкубировали при 4 °С в течение 4 ч. Среду аспирировали, клетки пятикратно промывали PBS перед добавлением раствора трипсин-ЭДТА 0,25 % (0,5 мл на чашку), после чего инкубировали в течение 10 мин. По истечении времени инкубации трипсин-ЭДТА нейтрализовывали 0,5 мл

полной среды, повторно суспендировали и переносили в пробирки для фракций. Из каждой пробирки брали пробу объемом 50 мкл для подсчета клеток. Радиоактивность клеток и меченые стандарты белка измеряли с помощью автоматического гамма-счетчика. Реальные концентрации добавленного меченого радиоактивным веществом белка были рассчитаны для каждой точки данных с использованием наибольшей концентрации. Затем рассчитывали радиоактивность, связанную с клетками, в виде пмоль/ $10^5$  клеток для каждого образца.  $B_{max}$  (максимальное количество сайтов связывания на клетку) и  $K_D$  рассчитывали с использованием Prism 9 для Windows (программное обеспечение GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США).

## 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

Работа посвящена исследованию *in vitro* радиофармацевтического препарата  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C на культурах раковых клеток. Объект исследования – радиотрейсер  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C и клеточные культуры SKOV-3 (рак яичников), SK-BR-3 (рак молочной железы) и PC-3 (рак предстательной железы). Данная модель *in vitro* имеет ряд преимуществ перед классическими методами испытаний на млекопитающих: меньшие временные и денежные затраты. Кроме того, с ее помощью, удается полностью обходить этические проблемы, связанные с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных.

### 4.1 Предпроектный анализ

#### 4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Данная работа нацелена на проведение исследований методом *in vitro* с использованием культур клеток в качестве биологических моделей для исследования специфичности перспективных для молекулярной визуализации радиотрейсеров в области онкологии.

Для анализа потребителей результатов исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование. Сегментирование – это разделение покупателей на однородные группы, для каждой из которых может потребоваться определенный товар (услуга).

Потенциальными потребителями НИР в основном являются юридические лица. Карта сегментирования рынка по области применения и доли рынка сбыта продукции приведена на таблице 4.

Таблица 4 – Карта сегментирования рынка по области применения *in vitro* исследований

Область реализации исследований	Доля, %
Фармацевтическая отрасль	35
Парфюмерно-косметическая отрасль	35

Пищевая отрасль	20
Диагностическая медицина	10

Из приведенной карты сегментирования можно сделать вывод, что основными областями применения *in vitro* исследований являются фармацевтическая и парфюмерно-косметическая отрасли, в них же наблюдается наибольшее число альтернативных методов. Потенциальными потребителями выбраны фармацевтическая и парфюмерно-косметическая отрасли.

#### **4.1.2 Анализ конкурентных технических решений**

В РФ и ЕАЭС (евразийском экономическом союзе) предъявляются обязательные требования безопасности к веществам, контактирующим с человеком. Одним из таких требований является индекс токсичности (общетоксическое действие).

Токсикологические испытания могут проводиться *in vivo* и *ex vivo* или *in vitro*.

Исследования *in vivo* предполагают использование живой ткани при живом организме. То есть, методами исследования *in vivo* являются тестирование на животных и клинические испытания на людях. Недостатками метода являются высокая стоимость исследований, определенные условия содержания (диета, анализ крови и др.), постоянная антибиотикотерапия для поддержания жизни, затрудненное размножение и негативное отношение общества к экспериментам над животными. Преимуществом метода является получение достоверных и достаточных по объему результатов, которые могут быть с успехом экстраполированы в клинику, применение различных моделей заболеваний на животных, а также использование генетически модифицированных видов способствует установлению механизмов фармакологического действия, эффективных доз, динамики значений маркеров патологии при длительном курсовом применении и др.

Исследования *ex vivo* представляют собой, как правило, изолированные органы и ткани живых организмов. Результаты исследований *ex vivo* также как и результаты *in vitro*, не могут являться основанием для начала клинических испытаний фармакологического вещества. Преимуществами исследований *ex vivo* являются широкая известность и то, что данные, полученные в результате исследований, как правило, характеризуются большей релевантностью клинике.

В таблице 5 приведена оценочная карта для сравнения конкурентных методов исследований. В таблице  $B_{\phi}$  обозначено разрабатываемое решение,  $B_{k1}$ ,  $B_{k2}$  – конкурентные методы исследований (аналоги): *in vivo* и *ex vivo*, соответственно.

Таблица 5 – Оценочная карта для сравнения конкурентных методов исследований

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		$B_{\phi}$	$B_{k1}$	$B_{k2}$	$K_{\phi}$	$K_{k1}$	$K_{k2}$
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Технические критерии оценки ресурсоэффективности</b>							
1. Надежность (достоверность) результатов	0,2	2	5	3	0,4	1	0,6
2. Трудоемкость исследований	0,2	5	1	3	1	0,2	0,6
3. Продолжительность исследований	0,2	5	1	4	1	0,2	0,8
4. Безопасность исследований	0,1	5	3	5	1	0,3	1
<b>Экономические критерии оценки эффективности</b>							
5. Затраты	0,3	5	1	4	1,5	0,3	1,2
<b>Итого</b>	1				4,9	2	4,2

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, приведенные в таблице 2, подбираются, исходя из выбранных объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей проведения исследований.

Позиция исследований *in vitro* и конкурентов оценивается по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая позиция, а 5 – наиболее сильная. Веса показателей, определяемые экспертным путем, в сумме должны составлять 1.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum V_i \cdot B_i,$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

$V_i$  – вес показателя (в долях единицы);

$B_i$  – балл  $i$ -го показателя.

Выводы:

1) по техническим критериям конкурент 1 уступает рассматриваемому методу, а конкурент 2 уступает незначительно;

2) по экономическим критериям конкурент 1 и конкурент 2 уступают рассматриваемому методу.

Исходя из расчётов, сделанных выше, можно сделать вывод, что исследования *in vitro* имеют высокий уровень конкурентоспособности.

### 4.1.3 Диаграмма Исикавы

Диаграмма причины-следствия Исикавы – это графический метод анализа и формирования причинно-следственных связей, применяемый для выявления причин возникновения проблемы.

В случае проводимой работы было выявлено, что наиболее вероятной проблемой является низкий радиохимический выход. Ввиду компетентности персонала и отсутствия неполадок с оборудованием, причины возникновения выявленной проблемы заключаются в методах и материалах. Было установлено, что выбранная методика не является оптимальной, а именно подобранные условия, т.е. условия проведения реакции без восстановления. Среди материалов возможной причиной являются реактивы, в частности, их низкое качество.

Т.о. причинно-следственная диаграмма Исикавы имеет вид (рис. 16):

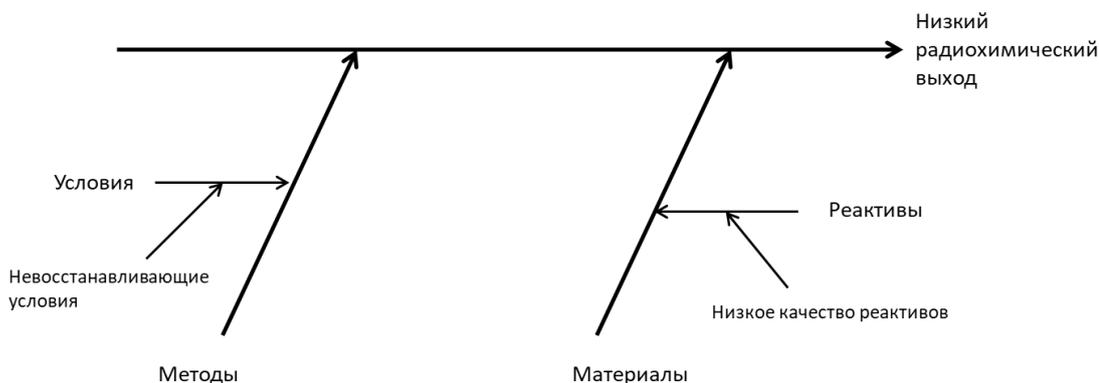


Рисунок 16 – Диаграмма Исикава

С помощью диаграммы Исикавы была установлена вероятная проблема, а также ее причины.

#### 4.1.4 SWOT-анализ

SWOT – (Strengths – сильные стороны, Weaknesses – слабые стороны, Opportunities – возможности и Threats – угрозы) – это комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Таблица 6 – Матрица SWOT-анализа

	<b>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</b>	<b>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</b>
	C1. Низкая трудоемкость	Сл1.Сложность экстраполяции данных на целый организм
	C2. Малые временные затраты	Сл.2 Процесс ненагляден
	C3. Малые денежные затраты	
	C4.Безопасность для исследователя и окружающей среды	
	C5. Этичность	
<b>Возможности:</b>		
V1. Сохранение жизни многим лабораторным животным на первых этапах исследований	C5. Исследования <i>in vitro</i> позволяют получить данные о биоактивности без массового убийства животных	Сл1. Переход к исследованиям <i>in vivo</i> только с самым лучшим кандидатом
V2. Биологическая доступность различных объектов исследования	C3. Приобретенные биообъекты способны размножаться и храниться в течение длительного периода	Сл2. Возможность создания 3D культур
<b>Угрозы:</b>		
У1. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства	C2. Отсутствие финансирования увеличит продолжительность исследований	Сл1. Отсутствие возможности закупить достаточное разнообразие биообъектов
У2. Контаминация питательной среды, культур клеток	C1. Повтор эксперимента и/или наращивание биомассы культуры заново	Сл2. Искажение результатов эксперимента

Согласно информации в разделе, правильное применение предоставляемых разработкой преимуществ может минимизировать вероятные риски, а также позволит получить финансирование для дальнейшего продвижения исследовательской работы.

Таблица 7 – Интерактивная матрица проекта

		Сильные стороны проекта					Слабые стороны проекта	
		C1	C2	C3	C4	C5	Сл1	Сл2
Возможности проекта	V1	0	-	-	+	+	+	+
	V2	+	-	+	+	0	-	+
Угрозы проекта	У1	-	+	+	-	-	+	0
	У2	+	+	+	+	-	-	+

## 4.2 Планирование научно-исследовательских работ

### 4.2.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научных исследований формируется рабочая группа, в чей состав входят: магистр, научный руководитель, консультант по части социальной ответственности (СО), консультант по экономической части (ЭЧ) и консультант по иностранному языку (ИЯ) выпускной квалификационной работы. Составим перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования и проведем распределение исполнителей по видам работ (таблица 8).

Таблица 8 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
1	2	3	4
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Научный руководитель, консультант ЭЧ, СО, ИЯ, магистр
Выбор направления исследований	2	Выбор направления исследований	Научный руководитель, магистр
	3	Подбор и изучение материалов по теме	Научный руководитель, магистр
	4	Патентный обзор литературы	Магистр
	5	Календарное планирование работ по теме	Научный руководитель, магистр
Теоретические исследования	6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Магистр
Обобщение и оценка результатов	7	Оценка эффективности полученных результатов	Научный руководитель, магистр
	8	Определение целесообразности проведения ВКР	Научный руководитель, магистр

## Продолжение таблицы 8

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
1	2	3	4
Проведение ВКР			
Разработка технической документации и проектирование	9	Оценка цитотоксичности стабильных активных радикалов с использованием культур клеток в качестве биологических моделей	Магистр, научный руководитель
	10	Оценка эффективности производства и применения разработки	Магистр, консультант по ЭЧ
	11	Разработка социальной ответственности по теме	Магистр, консультант СО
	12	Разработка английской части ВКР	Магистр, консультант ИЯ
Оформление комплекта документации по ВКР	13	Составление пояснительной записки	Магистр

### 4.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества трудно учитываемых факторов. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости  $t_{ожi}$  используется формула:

$$t_{ожi} = \frac{3t_{\min i} + 2t_{\max i}}{5},$$

где  $t_{ожi}$  – ожидаемая трудоемкость выполнения  $i$ -ой работы, чел. – дн.;

$t_{\min i}$  – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной  $i$ -ой работы, чел. – дн.;

$t_{\max i}$  – максимально возможная трудоемкость выполнения заданной  $i$ -ой работы (пессимистическая оценка: в предположении наиболее неблагоприятного стечения обстоятельств), чел. – дн.

Исходя из ожидаемой трудоемкости работ, определяется продолжительность каждой работы в рабочих днях  $T_p$ , учитывающая параллельность выполнения работ несколькими исполнителями:

$$T_{pi} = \frac{t_{ожi}}{Ч_i},$$

где  $T_{pi}$  – продолжительность одной работы, раб.дн.;

$t_{ож i}$  – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел. – дн.;

$Ч_i$  – численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

#### 4.2.3 Разработка графика проведения научного исследования

При выполнении дипломных работ студенты становятся участниками сравнительно небольших по объему научных тем, поэтому наиболее удобным и наглядным является построение ленточного графика проведения научных работ в форме диаграммы Ганта.

Диаграмма Ганта – это горизонтальный ленточный график, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. Данный график строится на основе таблицы 6.

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней следует перевести в календарные дни. Для этого необходимо воспользоваться формулой :

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}},$$

где  $T_{ki}$  – продолжительность выполнения  $i$  – й работы в календарных днях;

$T_{pi}$  – продолжительность выполнения  $i$  – й работы в рабочих днях;

$k_{\text{кал}}$  – коэффициент календарности.

Коэффициент календарности определяется по формуле:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}},$$

где  $T_{\text{кал}}$  – количество календарных дней в году;

$T_{\text{вых}}$  – количество выходных дней в году;

$T_{\text{пр}}$  – количество праздничных дней в году.

Таким образом:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}} = \frac{142}{142 - 18 - 4} = 1,18.$$

Результаты расчетов занесены в таблицу 9.

Таблица 9 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Название работ	Трудоемкость работ			Испол- нители	Т <sub>р</sub> , раб. дн.	Т <sub>к</sub> , кал. дн.
		t <sub>min</sub> , чел- дн.	t <sub>max</sub> , чел- дн.	t <sub>ож</sub> , чел- дн.			
1	Составление технического задания	0,3	1	0,6	Р	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	М	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	К <sup>1</sup>	0,15	0,2
		0,3	1	0,6	К <sup>2</sup>	0,15	0,2
2	Выбор направления исследований	0,5	2	1	Р	0,5	0,6
		0,5	2	1	М	0,5	0,6
3	Подбор и изучение материалов	6	12	8,4	Р	4,2	5
		6	12	8,4	М	4,2	5
4	Литературный обзор	7	10	8,2	М	8,2	9,7
5	Календарное планирование работ по теме	1	2	1,4	Р	0,7	0,8
		1	2	1,4	М	0,7	0,8
6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	2	3	2,4	М	2,4	2,8
7	Оценка эффективности результатов	2	3	2,4	Р	1,2	1,4
		5	7	5,8	М	2,9	3,4
8	Определение целесообразности проведения ВКР	6	7	6,4	Р	3,2	3,8
		6	7	6,4	М	3,2	3,8

9	Оценка специфичности, процессинга и интернализации меченного дарпина на культурах клеток в качестве биологических моделей	5	10	7	М	7	8,3
11	Разработка СО	7 7	10 10	8,2 8,2	М К <sup>2</sup>	4,1 4,1	4,8 4,8
12	Разработка ИЯ	7 7	10 10	8,2 8,2	М К <sup>3</sup>	4,1 4,1	4,8 4,8
13	Составление пояснительной записки	10	15	12	М	12	14,2

Р – руководитель;

М – магистр;

К<sup>1</sup> – консультант по экономической части;

К<sup>2</sup> – консультант по социальной ответственности;

К<sup>3</sup> – консультант по иностранному языку.

На основании таблицы был построен календарный план-график. График строится для максимального по длительности исполнения работ в рамках научного исследования. План-график приведен в таблице 10.

Таблица 10 – Календарный план-график проведения НИОКР

Вид работы	Исполнители	$T_{ki}$ , дней	Продолжительность выполнения работ													
			февраль		март			апрель			май					
			2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Составление технического задания	Руководитель, Магистр, консультант ЭЧ, СО, ИЯ	0,2	■													
Выбор направления исследований	Руководитель, Магистр	0,6	■	■												
Подбор и изучение материалов	Руководитель, Магистр	5		■												
Патентный обзор литературы	Магистр	9,7		■	■											
Календарное планирование работ	Руководитель, Магистр	0,8				■	■									
Проведение теоретических расчетов и обоснований	Магистр	2,8					■	■								
Оценка эффективности полученных результатов	Руководитель, Магистр	1,4 3,4						■	■							
Определение целесообразности проведения ВКР	Руководитель, Магистр	3,8							■	■						
Оценка цитотоксичности	Магистр	8,3								■	■	■				
Оценка эффективности производства и применения разработки	Магистр, консультант ЭЧ	4,8										■	■			
Разработка социальной ответственности	Магистр, консультант СО	4,8											■	■		
Разработка главы на иностранном языке	Магистр, консультант ИЯ	4,8												■	■	
Составление пояснительной записки	Магистр	14														■

■ - Руководитель, ■ - Магистр, ■ - консультант ЭЧ, ■ - консультант СО, ■ - консультант ИЯ

#### **4.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)**

В процессе формирования бюджета НТИ используется следующая группировка затрат по статьям:

- материальные затраты НТИ;
- затраты на оборудование;
- основная заработная плата исполнителей темы;
- дополнительная заработная плата исполнителей темы;
- отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления);
- накладные расходы.

Материальные затраты НТИ включают стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта, в частности, сырье и материалы, покупные комплектующие изделия и полуфабрикаты, используемые в качестве объектов исследований (испытаний) и для эксплуатации, технического обслуживания и ремонта изделий – объектов испытаний (исследований). Материальные затраты и затраты на оборудование для данного НТИ представлены в таблицах 11-12.

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по данной теме. Определение стоимости спецоборудования производили по действующим прейскурантам с учетом НДС. При приобретении спецоборудования учтены затраты по его доставке и монтажу в размере 15 % от его цены. Все расчеты по приобретению спецоборудования и оборудования, используемого для каждого исполнения темы, сводятся в таблице 9.

Таблица 11 – Материальные затраты

	Ед. измер	Количество	Цена за ед. руб.	Сумма, руб.
Клеточная линия SKOV-3	шт. (криопробирка)	1	51500,00	51500,00
Клеточная линия SK-BR-3	шт. (криопробирка)	1	54000,00	54000,00
Клеточная линия РС-3	шт. (криопробирка)	1	51500,00	51500,00
Питательная среда RPMI-1640	л	3	1300,00	3900,00
Раствор PBS	л	0,2	3640,00	728,00
Раствор трипсин-ЭДТА 0,25%	л	0,1	2800,00	280,00
Этиловый спирт	л	5	155,00	775,00
6-луночный планшет	шт.	50	110,00	5500,00
Чашки Петри 35 мм	шт.	5	400,00	2000,00
Флаконы стерильные	уп.	1	650,00	650,00
Наконечники	уп.	10	550,00	5500,00
Пробирки	уп.	2	700,00	1400,00
<b>Сумма</b>				<b>177 733</b>

Таблица 12 – Затраты на оборудование для научно-экспериментальных работ

№, п/п	Наименование оборудования	Количество единиц оборудования, шт	Цена единицы оборудования, руб.
1	Вортекс	1	15500,00
2	Источник питания	1	23000,00
3	Ламинарный бокс	1	836000,00
4	Микроскоп	1	550000,00
5	СО-2 инкубатор	1	700000,00
6	Термошейкер	1	110000,00
7	Фотометр	1	700000,00
8	Центрифуга	1	200000,00
<b>Итого</b>			<b>3134500,00</b>

Для оборудования нужно рассчитать величину годовой амортизации по следующей формуле:

$$A = \frac{C_n \cdot H_a \cdot n}{100 \cdot k},$$

где  $C_n$  – первоначальная стоимость оборудования;

$H_a$  – норма амортизации, %;

$n$  – количество дней использования оборудования;

$k$  – количество рабочих дней в году (2021 год – 247 раб. дней).

Результаты расчетов приведены в таблице 13.

Таблица 13 – Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

Наименование оборудования	$C_n$ , руб	$H_a$ , %	$n$ , дн	$A$ , руб
Вортекс	23000,00	10	10	62,75
Источник питания	836000,00		7	65,18
Ламинарный бокс	550000,00		50	16923,08
Микроскоп	700000,00		20	4453,44
СО-2 инкубатор	110000,00		60	17004,05
Термошейкер	700000,00		15	668,02
Фотометр	200000,00		20	5668,02
Центрифуга	15500,00		20	1619,43
<b>Итого</b>				<b>46463,97</b>

Статья заработной платы исполнителей темы включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ и дополнительную заработную плату:

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп},$$

где  $Z_{осн}$  – основная заработная плата;

$Z_{доп}$  – дополнительная заработная плата (12-20 % от  $Z_{осн}$ ).

Основная заработная плата ( $Z_{осн}$ ) руководителя от предприятия рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_p,$$

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d},$$

где  $Z_m$  – месячный должностной оклад работника, руб.;

$M$  – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 24 раб.дня  $M = 11,2$  месяца, 5-дневная неделя;

при отпуске в 48 раб.дней  $M = 10,4$  месяца, 6-дневная неделя;

$F_d$  – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (Табл. 14).

Таблица 14 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Магистр
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней	52	52
- выходные дни	14	14
- праздничные дни		
Потери рабочего времени		
- отпуск	48	24
- невыходы по болезни	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	251	275

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p$$

где  $Z_{тс}$  – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

$k_{пр}$  – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от  $Z_{тс}$ );

$k_d$  – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно

0,2 – 0,5;

$k_p$  – районный коэффициент, равный 1,3 для Томска.

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 15.

Таблица 15 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	$Z_{тс}$ , руб	$k_{пр}$	$k_d$	$k_p$	$Z_m$ , руб	$Z_{дн}$ , руб	$T_p$ , раб.дн.	$Z_{осн}$ , руб
Научный руководитель	35120,00	0,3	0,3	1,3	73049,60	3406,80	9,95	33897,64
Магистр	12300,00	0	0	1,3	15990,00	673,26	49,45	33292,86

Общая заработная плата исполнителей работы представлена в таблице 16.

Таблица 16 – Общая заработная плата исполнителей

Исполнитель	$Z_{осн}$ , руб.	$Z_{доп}$ (12 %), руб.	$Z_{зп}$ , руб.
Руководитель	33897,64	4067,716	37965,35
Магистр	33292,86	3995,144	37288,01
<b>Итого</b>	<b>67190,5</b>	<b>8062,86</b>	<b>75787,36</b>

В статье расходов – отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления) отражаются обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам государственного социального страхования (ФСС), пенсионного фонда (ПФ) и медицинского страхования (ФФОМС) от затрат на оплату труда работников.

Величина этих отчислений определяется по следующей формуле:

$$Z_{внеб} = k_{внеб} \cdot (Z_{осн} + Z_{доп}),$$

где  $k_{внеб}$  – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

Тарифы страховых взносов в 2023 году остались на прежнем уровне в соответствии с постановлением Правительства РФ от 26.11.2015 № 1265, т. е. есть общий совокупный тариф все также составляет 30%, в том числе: 22 процента – в ПФ РФ; 2,9 процента – в ФСС России; 5,1 процента – в ФФОМС.

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.	Отчисления во внебюджетные фонды, руб.
Руководитель проекта	33897,64	4067,72	37965,36
Магистр	53268,58	0	53268,58
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,302		
<b>Итого</b>			<b>27552,65</b>

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование графических материалов, оплата услуг связи, электроэнергия, транспортные расходы и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 5) \cdot k_{\text{нр}},$$

где  $k_{\text{нр}}$  – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов  $k_{\text{нр}}$  допускается взять в размере 16%. Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в качестве нижнего предела затрат.

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект приведен в таблице 18.

Таблица 18 – Бюджет затрат на научно-исследовательский проект

Наименование статьи	Сумма, руб.	Примечание
1. Материальные затраты НТИ	177 733	Табл. 8
2. Затраты на специальное оборудование для научных работ (амортизация)	46463,97	Табл. 10
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	4067,72	Табл. 14
5. Отчисления во внебюджетные фонды	27552,65	Табл. 14
6. Затраты на научные и производственные командировки	-	-
7. Накладные расходы	51681,25	16 % от

		суммы ст.1-6
<b>Итого: бюджет затрат НИИ</b>	<b>374689,09</b>	<b>Сумма ст. 1-7</b>

### **4.3 Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования**

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

#### **4.3.1 Интегральный финансовый показатель**

Интегральный финансовый показатель определяется как:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}$$

где  $I_{\phi}^p$  - интегральный финансовый показатель разработки;  $\Phi_{pi}$  - стоимость  $i$ -го варианта исполнения;  $\Phi_{\max}$  - максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Стоимость альтернативных вариантов исполнения не известна, поэтому примем стоимость нашего проекта за 1, тогда интегральный финансовый показатель альтернативных вариантов будет показывать, во сколько раз они дороже или выгоднее нашего варианта.

*Интегральный показатель ресурсоэффективности* вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом по формуле (таблица 19):

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i,$$

где  $I_{pi}$  - интегральный показатель ресурсоэффективности для  $i$ -го варианта разработки или аналога;

$a_i$  - весовой коэффициент  $i$ -го параметра;

$b_i$  - бальная оценка  $i$ -го варианта разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

В качестве аналогичной технологии для определения интегрального финансового показателя также принято использование для визуализации меченных технецием-99m рекомбинантных таргетных молекул DARPin 9\_29 – [DOI: 10.1155/2018/6930425].

Таблица 19 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии	Весовой коэффициент параметра	Объект исследования	
		Исп.1	Исп.2
1. Надежность (достоверность) результатов	0,30	2	5
2. Трудоемкость исследований	0,30	4	2
3. Продолжительность исследований	0,25	4	2
4. Безопасность исследований	0,15	5	3
Итого	1	3,6	3,1

Исполнение 1 соответствует данному проекту – исследованиям DARPin G3, исполнение 2 – исследованиям DARPin 9\_29

**Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки** ( $I_{испi}$ ) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле

Данные показатели определяются на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_\phi^p}, \quad I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_\phi^a}$$

$$I_{текущ.} = \frac{3,6}{1} = 3,6, \quad I_{ан.1} = \frac{3,1}{1} = 3,1$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта. Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a}$$

где  $\mathcal{E}_{cp}$  – сравнительная эффективность проекта;  $I_{тэ}^p$  – интегральный показатель разработки;  $I_{тэ}^a$  – интегральный технико-экономический показатель аналога.

$$\mathcal{E}_{cp,тек} = \frac{3,6}{3,6} = 1, \quad \mathcal{E}_{cp,ан.1} = \frac{3,1}{3,6} = 0,86$$

Таблица 20 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Аналог	Разработка
1	Интегральный финансовый показатель разработки	1	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	3,6	3,1
3	Интегральный показатель эффективности	3,6	3,1
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1	0,86

Сравнение среднего интегрального показателя проектов позволяет сказать о том, что текущий проект является более ресурсо- и финансовоэффективным/

### Вывод

В ходе разработки данного раздела была проведена оценка перспективности научного исследования *in vitro* радиофармацевтического препарата  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C на культурах раковых клеток, а также его аналога с целью сравнения их преимуществ и недостатков.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что созданная методика может быть нишевым продуктом на рынке, поскольку ей

удастся превзойти конкурентов только в отдельных элементах. По результатам анализа конкурентных технических решений наша разработка признана конкурентоспособной. Главными её преимуществами являются цена исходных веществ и безопасность исследований.

Проектный бюджет составил: 374689,09 руб.

Результаты оценки эффективности ВКР следующие:

- значение интегрального финансового показателя ВКР – 1;
- значение интегрального показателя ресурсоэффективности – 3,6;
- значение интегрального показателя эффективности ВКР

составляет – 3,6.

## **5 Социальная ответственность**

Работа посвящена исследованию *in vitro* радиофармацевтического препарата  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C на культурах раковых клеток.

Объект исследования – радиотрейсер  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C и клеточные культуры SKOV-3 (рак яичников), SK-BR-3 (рак молочной железы) и PC-3 (рак предстательной железы).

Цель исследования: оценка специфичности связывания  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C с рецептором эпидермального фактора роста человека HER2, оценка клеточного процессинга и интернализации  $^{99m}\text{Tc}$  DARPIn G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C, оценка равновесной константы диссоциации, с использованием культур раковых клеток в качестве биологических моделей.

Исследуемый радиотрейсер в перспективе будет использоваться в качестве диагностического препарата для визуализации раковых опухолей со гиперэкспрессией рецепторов HER2, поэтому он должен обладать следующими свойствами:

- Высокая специфичность связывания с рецептором эпидермального фактора роста человека HER2;
- Высокая аффинность к онкомаркеру HER2 с константой диссоциации в наномолярном диапазоне.

Данный раздел включает в себя оценку условий труда на рабочем месте, анализ вредных и опасных факторов труда, разработку мер защиты от них.

### **5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности**

Согласно Трудовому кодексу Российской Федерации [58], продолжительность рабочей недели не должна превышать 40 часов при пятидневной неделе, и 48 часов при шестидневной. Все работники лаборатории обязаны пройти инструктаж по технике безопасности: знать меры при возникновении ЧС, расположение первичных средств

пожаротушения, план эвакуации и нахождение кнопок оповещения. Существуют методические рекомендации, которые необходимо соблюдать работнику лаборатории:

- к работе не допускаются лица, не прошедшие инструктаж (периодичность – 2 раза в год);
- работа с химическими веществами запрещена беременным женщинам и несовершеннолетним;
- все работающие в лаборатории должны раз в год проходить медицинский осмотр;
- все работающие в лаборатории должны быть обеспечены необходимой спецодеждой и средствами индивидуальной защиты.

В конце рабочего дня сотрудники лаборатории обязаны проверить, отключены ли от электрической сети используемые на рабочем месте приборы и оборудование (за исключением боксов биобезопасности, низкотемпературных холодильников, CO<sub>2</sub>-инкубаторов). Использованные пластиковые материалы обрабатываются дезинфицирующим средством, после чего выбрасываются в одноразовые медицинские пакеты и отправляются на дальнейшую утилизацию в специализированные учреждения, все поверхности стерилизуются 70 % раствором этилового спирта, в боксах биобезопасности включается обработка ультрафиолетом, все используемые растворы (питательные среды, буферы и т.д.) убираются в холодильник.

## **5.2 Производственная безопасность**

### **5.2.1 Анализ выявленных вредных факторов**

Опасные и вредные производственные факторы производственной среды по природе их воздействия на организм работающего человека подразделяют [59]:

- на факторы, воздействие которых носит физическую природу;
- факторы, воздействие которых носит химическую природу;
- факторы, воздействие которых носит биологическую природу.

Перечень вредных и опасных факторов, возникающий при данных исследованиях в лаборатории, представлен в таблице 1.

Таблица 21 – Возможные вредные и опасные факторы, возникающие в лаборатории

Опасные факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Нормативные документы
Вещества, обладающие острой токсичностью по воздействию на организм;	ГОСТ 12.0.003-2015 Система стандартов по безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация [59]. СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [61].
Вещества, вызывающие поражение (некроз/омертвление или раздражение) кожи;	СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [61].
Электрический ток, вызываемым разницей электрических потенциалов, под действие которого попадает работающий (короткое замыкание);	ГОСТ 12.1.019-2017. Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [68].
Электромагнитные поля постоянного характера, связанные с повышенным образованием электростатических зарядов (статическое электричество);	
Электромагнитные поля, неионизирующие ткани тела человека переменного характера, связанные с наличием электромагнитных полей промышленных частот (порядка 50 – 60 Гц).	
Движущиеся элементы оборудования общелабораторной центрифуги с высокой скоростью вращения (до 15 000 об/мин).	ГОСТ 31836-2012 Центрифуги промышленные. Требования безопасности. Методы испытаний []
Вредные факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Нормативные документы
Канцерогенные вещества	СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [66].

Монотонность труда, вызывающая монотонию;	Р 2.2.2006-05.2.2. Гигиена труда., Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда [1].
Число производственных объектов одновременного наблюдения.	
Нервно-психические перегрузки, связанные с напряженностью трудового процесса;	
Повышенный уровень шума и ультразвуковых колебаний (воздушного и контактного ультразвука);	СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [61]. ГОСТ 12.1.003-2014 Система стандартов безопасности труда. Шум. Общие требования безопасности [65].
Механические колебания твердых тел и их поверхностей, характеризуемые повышенным уровнем локальной вибрации;	СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [66].
Аномальные микроклиматические параметры воздушной среды на местонахождении работающего: температура и относительная влажность воздуха, а также тепловое излучение окружающих поверхностей;	СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания [61].
Недостаточный уровень освещения рабочей зоны	СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95* (с Изменением N 1) [60].
Неионизирующие излучения, такие как инфракрасное и ультрафиолетовое излучение.	СП 2.2.3670-20 Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда [62].
Ионизирующее гамма-излучение	СанПиН 2.6.1.2523-09 Нормы радиационной безопасности [67].

### **5.2.2. Контакт с токсичными химическими веществами**

Контакт с токсичными веществами относится к факторам, порождаемым химическими свойствами находящихся в рабочей зоне веществ. Задачей защиты является исключение или снижение до допустимых пределов попадания в организм человека вредных веществ, контакта с вредными или опасными объектами. Вредные вещества могут попадать в организм человека с вдыхаемым воздухом, питьевой водой, пищей, проникать через кожу.

В рабочей зоне необходимо обеспечить такие уровни негативных факторов, которые не вызывают ухудшения состояния здоровья человека,

заболеваний. Для исключения необратимых изменений в организме человека необходимо ограничить воздействие негативных химических факторов предельно допустимыми концентрациями (далее – ПДК).

Лаборатория, снабжена приточно-вытяжной вентиляцией и вытяжным шкафом для защиты органов дыхания и слизистой оболочки глаз. Кроме того, используются средства индивидуальной защиты (далее – СИЗ): перчатки и халаты, для предотвращения попадания вредных веществ на кожу.

Для обеспечения безопасности труда при контакте с токсичными и раздражающими веществами должны осуществляться следующие мероприятия:

- включение в стандарты или технические условия на сырье, продукты и материалы токсикологических характеристик вредных веществ;
- включение данных токсикологических характеристик вредных веществ в технологические регламенты;
- применение средств индивидуальной защиты рабочих;
- специальная подготовка и инструктаж обслуживающего персонала;
- проведение предварительных и периодических медицинских осмотров лиц, имеющих контакт с вредными веществами;
- применение специальных систем по улавливанию и утилизации газов, рекуперацию вредных веществ и очистку от них технологических выбросов, нейтрализацию отходов производства, промывных и сточных вод;

### **5.2.3. Контакт с чрезмерно нагретыми или охлаждёнными поверхностями**

Источниками термических ожогов могут служить поверхности электронагревательных установок, нагретая стеклянная или металлическая посуда, а также реакционные сосуды с жидким азотом.

Для предотвращения травм рабочего персонала при работе с нагретыми или охлаждёнными поверхностями при невозможности использования теплоизоляции, согласно СП 61.13330.2012., должны применяться средства индивидуальной защиты. Также при размещении электронагревательных установок и реакционных сосудов с жидким азотом следует располагать их во второй рабочей зоне [60].

Для индикации нагретых поверхностей производителем электрических мешалок с нагревом данные изделия сопровождаются знаками жёлтого цвета на передней панели и возле нагревательного элемента. Индикация нагретой поверхности парового автоклава отмечается желтым знаком, размещенным на передней панели устройства под ручкой двери.

#### **5.2.4. Короткое замыкание**

Для защиты от электрического и термического действия электрической дуги на тело рабочего должна применяться специальная термо- и электроустойчивая одежда, обувь и средства защиты рук и головы с дополнительным заземлением.

Защиту при нормальных условиях (от прямого прикосновения) обеспечивают посредством основной защиты, а защиту при условиях единичного повреждения (при косвенном прикосновении) обеспечивают посредством защиты при повреждении [61].

Для защиты от прямого воздействия электрического тока необходимо применять следующие технические способы и средства (основная защита):

- основная изоляция;
- защитные оболочки;
- автоматическое отключение питания;

Защита при повреждении должна состоять из одного или нескольких способов, указанных выше, а также применяемых к ним:

- электрозащитных средств и других СИЗ;
- проведение первичного инструктажа при трудоустройстве и периодического согласно требованиям по охране труда.

### **5.2.5. Статическое электричество**

Для защиты оборудования и рабочего от действия разрядов статического электричества должна применяться место работы оборудуется дополнительным металлическим заземлённым контуром, используемым для рассеяния накопленной разности потенциалов в почву.

Для защиты от прямого воздействия электрического тока необходимо применять следующие технические способы и средства (основная защита):

- защитные барьеры;
- выравнивание потенциалов.

Защита при повреждении должна состоять из одного или нескольких способов, указанных выше, а также применяемых к ним:

- автоматического отключения питания;
- электрозащитных средств и других СИЗ.

Применение увлажнителей воздуха в лаборатории клеточных испытаний не рекомендуется из-за необходимости поддерживать фиксированную влажность воздуха в клеточных инкубаторах и ламинарных шкафах. Избыточная влажность может привести к росту бактерий и плесневых грибов, и последующей контаминации клеточных культур. Рекомендована периодическая влажная уборка открытых поверхностей от пыли.

### **5.2.6. Действие электрического тока**

Проводящие части, находящиеся под опасным рабочим, наведённым, остаточным напряжением, не должны быть доступными, а доступные проводящие части не должны находиться под опасным напряжением при нормальных условиях (при отсутствии повреждения), а также в случае единичного повреждения.

Защиту обеспечивают одновременным применением основной защиты и защиты при повреждении, указанных в разделах 5.2.4. и 5.2.5.

К работе допускаются только сотрудники, прошедшие инструктаж.

### **5.2.7 Вещества, вызывающие поражение (некроз/омертвление или раздражение) кожи**

При работе с веществами, вызывающими раздражение или омертвление кожных покровов, необходимо использовать средства индивидуальной защиты. Для защиты кожи рабочих используются:

- спецодежда;
- спецобувь;
- перчатки и рукавицы;
- фартуки.

Также применяют барьерные пасты и мази, специальные моющие очищающие средства.

### **5.2.8 Контакт с канцерогенными химическими веществами**

В лаборатории клеточных испытаний не используются канцерогенные химические вещества. Однако в случае необходимости работы с такими веществами для защиты от раздражающих и летучих канцерогенных веществ в лаборатории предусмотрены следующие меры предосторожности: работа в вытяжном шкафу, регулярный контроль и ремонт оборудования, СИЗ и СКЗ. Все работники обязаны работать в лаборатории в специальной одежде [61].

### **5.2.9 Предотвращение возникновения состояния монотонии**

С целью предотвращения монотонии во время выполнения исследовательской работы рекомендуется каждые 45-50 минут делать перерывы по 10-15 минут с умеренной физической нагрузкой [62]. Также следует чередовать работу в положениях сидя и стоя при смене часового интервала. Для обеспечения удобства наблюдения за диффузными кромками хроматографических колонн и уровнем заполнения стеклянных флаконов рекомендуется укрепить за ними белый фон с пометками, что позволит эффективнее наблюдать за процессом.

### **5.2.10 Большое число объектов одновременного наблюдения**

В ходе работы по культивированию клеток требуется проведение множества различных процедур. В случае работы с разными клеточными

линиями необходимо учитывать множество разных параметров, таких как использование разных флаконов и материалов, разное время инкубации клеточных линий, различные объемы используемых для культивирования клеток растворов и т.д. При обоснованной невозможности сокращения объектов единовременного наблюдения, персоналу во время проведения исследовательской работы необходимо делать перерывы согласно комплексу по предотвращению развития монотонии [62].

#### **5.2.11 Нервно-психологические перегрузки**

Напряженность трудового процесса оценивают в соответствии с настоящим Р 2.2.2006-05.2.2. Руководством по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса [63].

Классом 3.2 оценивается работа, связанная с восприятием сигналов с последующей комплексной оценкой всей производственной деятельности. В этом случае, когда трудовая деятельность требует восприятия сигналов с последующей комплексной оценкой всех производственных параметров (информации), соответственно такой труд по напряженности относится к классу 3.2 (руководители промышленных предприятий, водители транспортных средств, авиадиспетчеры, конструкторы, врачи, научные работники и т.д.).

Сотрудникам требуется соблюдать режим труда и отдыха, а также запрещается выполнять связанные с работой задачи во внерабочее время.

#### **5.2.12 Повышенный уровень шума и ультразвуковых колебаний (воздушного и контактного ультразвука)**

Одним из наиболее распространенных в производстве вредных факторов является шум. Он создается рабочим оборудованием, преобразователями напряжения, рабочими лампами дневного света, а также проникает снаружи и оказывает вредное воздействие [64].

В лаборатории клеточных исследований находится оборудование, являющееся источником шума, к нему относятся: ламинарный бокс и центрифуга.

Эквивалентный уровень звука на данном рабочем месте составляет 48,8 дБ. Нормативное значение, согласно ГОСТ 12.1.003-2014 [64], для работников лаборатории, выполняющих умственную работу с часто получаемыми указаниями и акустическими сигналами, рекомендуемый уровень шума – 60 дБ, а предельно допустимый уровень – 82 дБ. Шум на рабочем месте не превышает предельно допустимый уровень звука, что соответствует требованиям Приказа Минтруда России № 33н от 24 января 2014 г. [65].

При значениях выше допустимого уровня необходимо предусмотреть средства индивидуальной защиты (СИЗ) и средства коллективной защиты (СКЗ) от шума и ультразвука.

Средства коллективной защиты:

- устранение причин шума или существенное его ослабление в источнике образования;
- изоляция источников шума от окружающей среды (применение глушителей, экранов, звукопоглощающих строительных материалов, например, шамотного кирпича);
- применение средств, снижающих шум на пути их распространения.

Средства индивидуальной защиты:

- применение спецодежды и защитных средств органов слуха: наушники, беруши, антифоны.

### **5.2.13 Механические колебания твердых тел и их поверхностей, характеризующиеся повышенным уровнем локальной вибрации**

Эквивалентный уровень локальной вибрации (инфразвука) на данном рабочем месте составляет 25,4 дБ. Нормативное значение, согласно СанПиН 1.2.3685-21 [62], производственных вибраций составляет (для частот 2-16 Гц) 85-100 дБ, максимальный текущий уровень инфразвука – не более 120 дБ.

Значение локальной вибрации на месте не превышает допустимые нормы, СИЗ (наушники) для работников выдаются только при

непосредственной работе с вибрирующей техникой. СКЗ от вибрации системы вентиляции аналогичны предусмотренным пунктом 5.2.11.

Средства коллективной защиты:

- существенное ослабление вибрации в источнике образования;
- изоляция источников вибрации от окружающей среды (применение глушителей, экранов, звукопоглощающих строительных материалов, например, шамотного кирпича);

Средства индивидуальной защиты:

- применение спецодежды и защитных средств органов слуха: наушники, беруши, антифоны.

#### **5.2.14 Аномальные микроклиматические параметры воздушной среды на местонахождении работающего: температура и относительная влажность воздуха, а также тепловое излучение окружающих поверхностей**

Несоответствие оптимальным микроклиматическим условиям является вредным фактором. К микроклиматическим параметрам воздушной среды в лаборатории относятся температура и относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха относительно тела инженера. Регламентируются они СанПиН 1.2.3685-21 [62].

Лаборатория клеточных исследований относится к категории Па. Допустимые значения параметров микроклимата в соответствии с СанПиН 1.2.3685-21 приведены в таблице 2.

Таблица 22 – Допустимые нормы микроклимата для категории работ Па

Температура воздуха, С°	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
15 – 28	20 – 80	< 0,5

Общая площадь отапливаемого помещения составляет 15 м<sup>2</sup>, объем – 52,5 м<sup>3</sup>. На основании [62] нормы составляют 4,5 м<sup>2</sup> площади и 15 м<sup>3</sup> объема помещения на одного человека. На

экспериментальном участке находятся не более 2 человек, а рабочие операции выполняет только 1 человек, следовательно, количество рабочих мест соответствует размерам помещения по санитарным нормам.

Рабочее место оснащено устройствами местной вытяжной и приточной вентиляции и возможностью естественного проветривания, что обеспечивает соблюдение гигиенических нормативов. Согласно нормам [62], объем воздуха необходимый на одного человека в помещении с естественным проветриванием должен быть не менее 30 м<sup>3</sup>. В нашем случае объем воздуха на одного работающего человека составляет 52,5 м<sup>3</sup>, из этого следует, что дополнительная вентиляция не требуется.

Фактический уровень параметров микроклимата на рабочем месте соответствует требованиям Приказа Минтруда России № 33н от 24 января 2014 года с изменениями на 27 апреля 2020 года [65].

#### **5.2.15 Недостаточный уровень освещённости рабочей зоны**

В лаборатории клеточных испытаний используется комбинированное совмещенное освещение – т.е. сочетание естественного, искусственного и местного освещения. Так как работа по культивированию клеток и осуществлению экспериментов *in vitro* зрительная, естественного освещения в данном случае недостаточно.

Согласно [66], освещенность производственного помещения для создания благоприятных условий труда должна быть не ниже 300 Лк и не выше 500 Лк с коэффициентом пульсации не более 10 %.

На рабочей поверхности должны отсутствовать резкие тени, которые создают неравномерное распределение поверхностей с различной яркостью в поле зрения, искажает размеры и формы объектов различия, в результате повышается утомляемость и снижается производительность труда.

С помощью метода коэффициента светового потока с учетом светового потока, отраженного от потолка и стен, рассчитаем общее равномерное искусственное освещение горизонтальной рабочей поверхности

для помещения с длиной  $A = 5$  м, шириной  $B = 3$  м, высотой  $H = 3,5$  м. и высотой.

Площадь помещения составляет  $15 \text{ м}^2$ .

Коэффициент отражения свежепобеленных стен с окнами, без штор  $\rho_C = 50\%$ , свежепобеленного потолка  $\rho_{П} = 70\%$ . Коэффициент запаса, учитывающий загрязнение светильника, для помещений с малым выделением пыли равен  $K_3 = 1,5$ . Коэффициент неравномерности для люминесцентных ламп  $Z = 1,1$ .

Выбираем лампу белой цветности ЛБ-40, световой поток которой равен  $\Phi_{\text{лд}} = 2800$  Лм.

Выбираем светильники с люминесцентными лампами типа ОД – 2 – 40. Этот светильник имеет две лампы мощностью 40 Вт каждая, длина светильника равна 1230 мм, ширина – 266 мм.

Интегральным критерием оптимальности расположения светильников является величина  $\lambda$ , которая для люминесцентных светильников без защитной решётки равна 1,4; принимаем расстояние светильников от перекрытия (свес)  $h_c = 0,5$  м.

Высота светильника над рабочей поверхностью определяется по формуле:

$$h = h_n - h_p,$$

где  $h_n$  – высота светильника над полом, высота подвеса,

$h_p$  – высота рабочей поверхности над полом.

$$h_n = H - h_c.$$

Наименьшая допустимая высота подвеса над полом для двухламповых светильников ОД – 3,5 м.

Высота светильника над рабочей поверхностью определяется по формуле:

$$h = H - h_c - h_p = 3,5 - 0,5 - 1 = 2,0 \text{ м.}$$

Расстояние между рядами определяется по формуле:

$$L = \lambda \cdot h = 1,4 \cdot 2,0 = 2,8 \text{ м.}$$

Число рядов светильников в помещении:

$$N_b = B / L = 3 / 2,8 = 1,07 \approx 1.$$

Число светильников в ряду:

$$N_a = A / L = 5 / 2,8 = 1,8 \approx 2.$$

Общее число светильников:

$$N = N_a \cdot N_b = 1 \cdot 2 = 2.$$

Расстояние от светильников до стены определяется по формуле:

$$l = L / 3 = 2,8 / 3 = 0,93 \text{ м.}$$

Потребный световой поток группы люминесцентных ламп светильника определяется по формуле:

$$\Phi_{\Pi} = (E_H \cdot S \cdot K_3 \cdot Z) / (N \cdot \eta),$$

где  $E_H$  – нормируемая минимальная освещённость по СНиП 23-05-95, лк;

$S$  – площадь освещаемого помещения, м<sup>2</sup>;

$K_3$  – коэффициент запаса, учитывающий загрязнение светильника;

$Z$  – коэффициент неравномерности люминесцентных ламп;

$N$  – число люминесцентных ламп в помещении;

$\eta$  – коэффициент использования светового потока.

$\eta$  определяем через индекс помещения:

$$i = \frac{S}{h \cdot (A+B)} = \frac{15}{2 \cdot (5+3)} = 0,94.$$

Коэффициент использования светового потока, показывающий какая часть светового потока ламп попадает на рабочую поверхность, для светильников типа ОД с люминесцентными лампами при  $\rho_{\Pi} = 70 \%$ ,  $\rho_C = 50\%$  и индексе помещения  $i = 0,94$  равен  $\eta = 0,48$ .

Тогда  $\Phi_{\Pi} = (E_H \cdot S \cdot K_3 \cdot Z) / (N \cdot \eta) = (300 \cdot 15 \cdot 1,5 \cdot 1,1) / (4 \cdot 0,48) = 3030,61 \text{ Лм.}$

Делаем проверку выполнения условия:

$$-10\% \leq \frac{\Phi_{\text{ЛД}} - \Phi_{\Pi}}{\Phi_{\text{ЛД}}} \cdot 100\% \leq 20\%;$$

$$\frac{\Phi_{ЛД} - \Phi_{П}}{\Phi_{ЛД}} \cdot 100\% = \frac{2800 - 3030,61}{2800} \cdot 100\% = -8,2\%.$$

Таким образом, мы получили, что необходимый световой поток не выходит за пределы требуемого диапазона. Теперь рассчитаем мощность осветительной установки:

$$P = 4 \cdot 40 = 160 \text{ Вт.}$$

Из условий равномерности освещения определяем расстояния  $L_1$  и  $L_1/3$  по уравнению:

$$5000 = L_1 + 2/3 \cdot L_1 + 2 \cdot 1230; L_1 = 1524 \text{ мм}; L_1/3 = 508 \text{ мм.}$$

План помещения и размещения светильников с люминесцентными лампами изображен на рисунке 17.

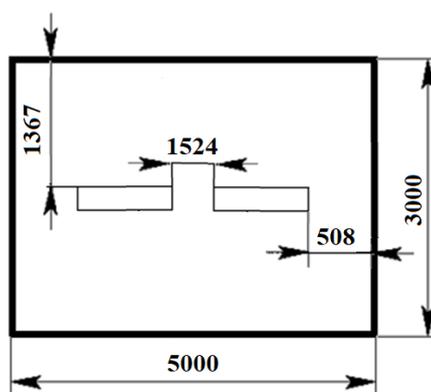


Рисунок 17 – План помещения и размещения светильников с люминесцентными лампами

### 5.2.16 Неионизирующие излучения

Источниками неионизирующего излучения в лаборатории клеточных испытаний являются ультрафиолетовые лампы, которыми оборудованы боксы биобезопасности. При работе УФ-лампы (254/350 нм) во время процедуры стерилизации рабочей зоны бокса биобезопасности не следует открывать бокс биобезопасности и не размещать в поле работ оголённые части тела [59].

Для защиты от УФ-излучения низкой мощности применяются СИЗ – защитные очки.

### 5.2.17 Ионизирующее гамма-излучение

Согласно СанПиН 2.6.1.2523-09 Нормы радиационной безопасности [67], минимально значимая активность радионуклида в комнате или на рабочем месте для технеция-99м составляет  $1 \times 10^7$  Бк/г, он относится к группе В радиационной опасности. В случае экспериментов, проводимых в рамках данной научно-исследовательской работы, значения активности технеция-99м не превышает  $0.6 \times 10^7$  Бк/г, что соответствует нормам радиационной безопасности.

Для контроля уровня радиации используются дозиметры-радиометры, гамма-счетчик. Радиоактивно меченные белки хранятся в свинцовых контейнерах, в качестве средств индивидуальной защиты используются перчатки, лабораторные халаты, чехлы на обувь, медицинские одноразовые шапочки, защитные очки. Все использованные материалы складываются в пакеты для радиоактивных отходов, после чего отвозятся на утилизацию в специализированные учреждения.

При работе с радионуклидами используются средства коллективной защиты и средства индивидуальной защиты.

К средствам коллективной защиты относятся:

- герметизирующие устройства (свинцовые контейнеры для переноски и хранения радиоактивных веществ, боксы радиационные защитные для совершения рабочих процедур с использованием радионуклидов);

К средствам индивидуальной защиты относятся:

- специальная одежда (свинцовые халаты, свинцовые фартуки)
- средства защиты рук (перчатки);
- средства защиты глаз (очки);
- специальная обувь (чехлы пластиковые на обувь). Одним из основных способов защиты от ионизирующего гамма-излучения также является защита временем (сокращения рабочего дня, увеличения продолжительности отпуска, более раннего выхода на пенсию, ограничения

стажа работы в определенных вредных условиях, введения и/или увеличения продолжительности перерывов во время трудового процесса).

### **5.2.18 Движущиеся элементы оборудования**

В лаборатории клеточных исследований движущиеся элементы оборудования характерны для лабораторной центрифуги.

Основными источниками опасности для обслуживающего персонала при работе центрифуги являются:

- вращающиеся части;
- динамические нагрузки в узлах и деталях;
- электрический ток и заряды статического электричества;
- свойства центрифугируемых продуктов (пожаро- и взрывоопасность, токсичность);
- температура поверхностей отдельных узлов и элементов.

Подвижные и вращающиеся части оборудования должны иметь защитные кожухи и ограждения, исключая возможность получения травмы обслуживающим персоналом [68]. Центрифуга должна быть заземлена и установлена на ровную горизонтальную поверхность. Перед началом работы необходимо плотно закрыть крышку центрифуги. Центрифугирование со снятой крышкой запрещается. Нарушать работу блокировки центрифуги запрещается.

## **5.3. Экологическая безопасность**

Анализ влияния процесса исследования и объекта исследования на окружающую среду.

### **5.3.1. Селитебная зона**

На селитебную зону могут оказывать влияние выбросы вредных и токсичных веществ и пары органических растворителей путём проникания через вентиляцию [69, 70].

Средства защиты для селитебной зоны являются суммой средств защиты из пунктов 5.3.2-5.3.4. Также применение дополнительных

воздушных фильтров способно свести к нулю опасность ряда аварийных ситуаций для жителей ближайших домов.

Исследуемый в рамках работы изотоп технеция-99м, являющийся источником гамма-излучения, при неправильном хранении и утилизации может оказывать вредное влияние на селитебную зону. Технеций 99-м имеет период полураспада 6 ч, что означает, что 93,7 % его распадается до технеция-99 за 24 ч [67]. Все использованные материалы складываются в пакеты для радиоактивных отходов, после чего отвозятся на утилизацию в специализированные учреждения. Данный радионуклид синтезируется в сорбционных генераторах технеция-99м на реакторе ИРТ-Т, что полностью отвечает требованиям стандартов GMP, кроме того, данное производство является безотходным.

### **5.3.2. Атмосфера**

В данной работе не используются вредные и токсичные вещества, которые могут оказывать вредное воздействие на атмосферу. Однако в случае работы с такими веществами все работы стоит проводить согласно требованиям по охране атмосферного воздуха [71, 72].

### **5.3.3. Гидросфера**

Вредное воздействие на гидросферу вызывается, обычно, удалением неорганических и органических отходов через хозяйственно-бытовую канализацию. В результате загрязнённые химикатами воды попадают в водоемы. Для предотвращения негативных воздействий организуется отдельный сбор, хранение жидких и твёрдых химических отходов, их вывоз и дальнейшая утилизация специализированными службами [73, 74]. В лаборатории клеточных испытаний жидкие отходы в виде спирта собираются в канистру и отправляются на перегонку в технический спирт.

### **5.3.4. Литосфера**

Чтобы сократить негативное воздействие твердых отходов, в виде бытового мусора, и твердого биоматериала, образующихся в лаборатории клеточных исследований, выполняют последовательность действий:

1. Твердый биоматериал и контактирующие с ним предметы удаляют в мягкую упаковку (одноразовые пакеты, маркированные желтым цветом с надписью «медицинские отходы», закрепленные в урнах);

2. После заполнения пакета примерно на 3/4 из него удаляют воздух, и сотрудник, ответственный за сбор отходов, осуществляет его герметизацию;

3. Транспортирование всех видов отходов класса Б вне пределов медицинского подразделения осуществляют только в одноразовой упаковке после ее герметизации.

Сбор отходов осуществляют до определенного момента и затем отвозят в специальные службы для утилизации [75].

#### **5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях**

По взрывопожарной и пожарной опасности помещения подразделяются на категории А, Б, В1-В4, Г и Д.

Согласно СП 12.13130.2009 «Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности» [76] лаборатория относится к категории ВП, в которых взрывоопасные пылевоздушные смеси могут образовываться только в случае производственных неисправностей. По степени огнестойкости данное помещение относится к 1-й степени огнестойкости по СП 2.13130.2020 [77, 78].

Для локализации или ликвидации загорания на начальной стадии используются первичные средства пожаротушения. Первичные средства пожаротушения обычно применяют до прибытия пожарной команды.

Огнетушители водо-пенные (ОХВП-10) используют для тушения очагов пожара без наличия электроэнергии. Углекислотные (ОУ-2) и порошковые огнетушители предназначены для тушения электроустановок, находящихся под напряжением до 1000 В. Для тушения токоведущих частей и электроустановок применяется переносной порошковый огнетушитель ОП-5.

В общественных зданиях и сооружениях на каждом этаже должно размещаться не менее двух переносных огнетушителей. Огнетушители следует располагать на видных местах вблизи от выходов из помещений на высоте не более 1,35 м. Размещение первичных средств пожаротушения в коридорах, переходах не должно препятствовать безопасной эвакуации людей.

Лаборатория полностью соответствует требованиям пожарной безопасности, а именно, наличие охранно-пожарной сигнализации, плана эвакуации, порошковых огнетушителей с поверенным клеймом, табличек с указанием направления к запасному (эвакуационному) выходу.

Лица, не прошедшие инструктаж по пожарной безопасности, не могут быть допущены к работе.

План эвакуации при пожаре и других ЧС изображен на рисунке 18.



Рисунок 18 – План эвакуации

Лаборатория находится в городе Томске с континентально-циклоническим климатом. Природные явления (землетрясения, наводнения, засухи, ураганы и т. д.), в данном городе отсутствуют.

В Томске возможными ЧС могут быть сильные морозы, в особенности, в зимнее время года. Достижение критически низких температур приводит к авариям систем тепло- и водоснабжения,

сантехнических коммуникаций и электроснабжения, приостановке работы. В этом случае при подготовке к зиме следует предусмотреть:

- 1) газобаллонные калориферы (запасные обогреватели);
- 2) дизель или бензоэлектрогенераторы;
- 3) запасы питьевой и технической воды на складе (не менее 30 л на 1 человека);
- 4) теплый транспорт для доставки работников на работу и с работы домой в случае отказа муниципального транспорта.

Их количества и мощности должно хватать для того, чтобы работа на производстве не прекратилась.

Для исключения возможности несчастных случаев должны проводиться обучение и проверка знаний работников о требованиях безопасности труда [79, 80].

### **Вывод**

В главе были рассмотрены все производственные факторы на изучаемом рабочем месте. Значения данных факторов соответствует нормам.

Данная лаборатория относится к помещениям без повышенной опасности, что означает, что при использовании электроустановок персонал должен иметь I группу допуска по электробезопасности, для получения которого все сотрудники обязаны проходить инструктаж [61].

По взрывопожарной и пожарной опасности, согласно СП 12.13130.2009 [76], лаборатория относится к категории ВП. По степени огнестойкости данное помещение относится к 1-й степени огнестойкости по СП 2.13130.2020 [77, 78].

В помещении постоянно или в течение длительного времени не хранятся агрессивные пары, газы, жидкости.

Рассмотренный объект оказывает минимальное негативное воздействие на окружающую среду и относится к объектам IV категории [79].

## Заключение

По результатам проделанной работы были сформированы следующие выводы.

– данный вариант DARPin G3 был успешно мечен  $^{99m}\text{Tc}$  с сохраненной способностью специфически связываться с клетками, экспрессирующими HER2. Согласно хроматографическому анализу, чистота препаратов составляла более 90%;

– связывание исследуемого конъюгата с HER2-экспрессирующими раковыми клетками человека зависело от уровня экспрессии HER2, что указывает на то, что связывание было HER2-специфичным;

– выявлен низкий уровень интернализованной активности. Однако связанная с клетками активность достигала максимума через 4 – 6 ч, а затем снижалась. Такая картина характерна для не оставляющих следов меток, когда метки из интернализированных и деградированных белков диффундируют из клеток;

– аффинность исследуемого варианта имела наномолярное значение, что достаточно для визуализации молекулярных мишеней с высокой экспрессией, таких как HER2.

В заключение отметим, что исследованный конъюгат  $^{99m}\text{Tc}$  DARPin-G3-(G<sub>3</sub>S)<sub>3</sub>C с хелатными группами на основе глицина, серина и цистеина отвечает всем требованиям *in vitro* для радиофармацевтических препаратов, а именно – высокой специфичностью и аффинностью к биологической мишени и способностью эффективно накапливаться в раковых клетках, что делает данный вариант DARPins перспективным для дальнейших исследований *in vivo*.

## Список публикаций студента

1. Фоминых А.С., Юлдашева Ф.Ш. Оценка специфичности и процессинга таргетного агента на основе  $^{99m}\text{Tc}$  и варианта DARPin G3 на опухолевых культурах *in vitro* // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 85-летию со дня рождения профессора А.В. Кравцова: в 2 т., Томск, 15-19 Мая 2022. - Томск: Изд-во ТПУ, 2023 - Т. 1 - С. 528-529

2. Юлдашева В.Ш., Фоминых А.С., Янович Г.Е.. Оценка нового технеций-99м содержащего радиохимического соединения на основе каркасных белков с хелатными группами // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 85-летию со дня рождения профессора А.В. Кравцова: в 2 т., Томск, 15-19 Мая 2022. - Томск: Изд-во ТПУ, 2023 - Т. 1 - С. 533-534

3. Юлдашева В.Ш., Фоминых А.С., Янович Г.Е. Исследование нового технеций-99м содержащего радиотрейсера на основе белка скаффолда с хелатными группами // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов: Москва, 10-21 Апреля 2023. – Москва: Изд-во МГУ, 2023. – Секция «Химия». – С. 867.

## Библиографический список

1. Gebhart G. et al. Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): the ZEPHIR trial //Annals of oncology. – 2016. – Т. 27. – №. 4. – С. 619-624. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419357424>
2. Mankoff D. A. et al. Development of companion diagnostics //Seminars in nuclear medicine. – WB Saunders, 2016. – Т. 46. – №. 1. – С. 47-56. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001299815001038>
3. Tolmachev V., Orlova A., Sørensen J. The emerging role of radionuclide molecular imaging of HER2 expression in breast cancer //Seminars in cancer biology. – Academic Press, 2021. – Т. 72. – С. 185-197. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X20302108>
4. Tolmachev V. M., Chernov V. I., Deyev S. M. Targeted nuclear medicine. Seek and destroy //Russian Chemical Reviews. – 2022. – Т. 91. – №. 3. – С. RCR5034. – URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1070/RCR5034/meta>
5. Yarden Y., Sliwkowski M. X. Untangling the ErbB signalling network //Nature reviews Molecular cell biology. – 2001. – Т. 2. – №. 2. – С. 127-137. – URL: <https://www.nature.com/articles/35052073>
6. Prenzel N. et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification //Endocrine-related cancer. – 2001. – Т. 8. – №. 1. – С. 11-31. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11350724/>
7. Chaffer C. L., Weinberg R. A. A perspective on cancer cell metastasis //science. – 2011. – Т. 331. – №. 6024. – С. 1559-1564. – URL: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.1203543>
8. Avraham R., Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops //Nature reviews Molecular cell biology. – 2011. – Т. 12. – №. 2. – С. 104-117. – URL: <https://www.nature.com/articles/nrm3048>

9. Citri A., Yarden Y. EGF–ERBB signalling: towards the systems level //Nature reviews Molecular cell biology. – 2006. – T. 7. – №. 7. – C. 505-516. – URL: <https://www.nature.com/articles/nrm1962>
10. Harari D., Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer //Oncogene. – 2000. – T. 19. – №. 53. – C. 6102-6114. – URL: <https://www.nature.com/articles/1203973>
11. Baselga J., Swain S. M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3 //Nature Reviews Cancer. – 2009. – T. 9. – №. 7. – C. 463-475. – URL: <https://www.nature.com/articles/nrc2656>
12. Lee-Hoeflich S. T. et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy //Cancer research. – 2008. – T. 68. – №. 14. – C. 5878-5887. – URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/68/14/5878/541686/A-Central-Role-for-HER3-in-HER2-Amplified-Breast>
13. Garrett J. T. et al. Combination of Antibody That Inhibits Ligand-Independent HER3 Dimerization and a p110 $\alpha$  Inhibitor Potently Blocks PI3K Signaling and Growth of HER2+ Breast CancersHER2/PI3K Blockade with HER3 Antibody and p110 $\alpha$  Inhibitor //Cancer research. – 2013. – T. 73. – №. 19. – C. 6013-6023. – URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/73/19/6013/584752>
14. Bose R. et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer //Cancer discovery. – 2013. – T. 3. – №. 2. – C. 224-237. – URL: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article-abstract/3/2/224/3639>
15. Arteaga C. L., Engelman J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics //Cancer cell. – 2014. – T. 25. – №. 3. – C. 282-303. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610814000865>
16. Carter P. et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992.

– T. 89. – №. 10. – C. 4285-4289. – URL:  
<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.89.10.4285>

17. Agus D. B. et al. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth //Cancer cell. – 2002. – T. 2. – №. 2. – C. 127-137. – URL:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610802000971>

18. Lewis Phillips G. D. et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody–cytotoxic drug conjugate //Cancer research. – 2008. – T. 68. – №. 22. – C. 9280-9290. – URL:  
<https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/68/22/9280/542757>

19. Rabindran S. K. et al. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase //Cancer research. – 2004. – T. 64. – №. 11. – C. 3958-3965. – URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/64/11/3958/511345>

20. Konecny G. E. et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells //Cancer research. – 2006. – T. 66. – №. 3. – C. 1630-1639. – URL:  
<https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/66/3/1630/526675>

21. Hudis C. A. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice //New England journal of medicine. – 2007. – T. 357. – №. 1. – C. 39-51. – URL: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra043186>

22. Vu T., Claret F. X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer //Frontiers in oncology. – 2012. – T. 2. – C. 62. – URL:  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2012.00062/full>

23. Nagata Y. et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients //Cancer cell. – 2004. – T. 6. – №. 2. – C. 117-127. – URL:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610804002107>

24. Berns K. et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer //Cancer

cell. – 2007. – T. 12. – №. 4. – C. 395-402. – URL:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610807002620>

25. Zhang S. et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways //Nature medicine. – 2011. – T. 17. – №. 4. – C. 461-469. – URL:  
<https://www.nature.com/articles/nm.2309>

26. Nahta R. et al. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells //Cancer research. – 2005. – T. 65. – №. 23. – C. 11118-11128. – URL:  
<https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/65/23/11118/518850>

27. Ritter C. A. et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network //Clinical Cancer Research. – 2007. – T. 13. – №. 16. – C. 4909-4919. – URL:  
<https://aacrjournals.org/clincancerres/article-abstract/13/16/4909/12956>

28. Shattuck D. L. et al. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells //Cancer research. – 2008. – T. 68. – №. 5. – C. 1471-1477. – URL:  
<https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/68/5/1471/543022>

29. Zhuang G. et al. Elevation of Receptor Tyrosine Kinase EphA2 Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy Elevation of EphA2 Promotes Anti-HER2 Resistance //Cancer research. – 2010. – T. 70. – №. 1. – C. 299-308. – URL:  
<https://aacrjournals.org/cancerres/article-abstract/70/1/299/559297>

30. Scaltriti M. et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer //Journal of the National Cancer Institute. – 2007. – T. 99. – №. 8. – C. 628-638. – URL:  
<https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/99/8/628/2522338>

31. Price-Schiavi S. A. et al. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for

herceptin resistance //International journal of cancer. – 2002. – Т. 99. – №. 6. – С. 783-791. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.10410>

32. Чернов В. И. и др. Ядерная медицина в диагностике и адресной терапии злокачественных новообразований //Бюллетень сибирской медицины. – 2018. – Т. 17. – №. 1. – С. 220-231. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/yadernaya-meditsina-v-diagnostike-i-adresnoy-terapii-zlokachestvennyh-novoobrazovaniy>

33. Tolmachev V., Orlova A., Andersson K. Methods for radiolabelling of monoclonal antibodies //Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols. – 2014. – С. 309-330. – URL: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-586-6\\_16](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-586-6_16)

34. Shah D. K., Betts A. M. Antibody biodistribution coefficients: inferring tissue concentrations of monoclonal antibodies based on the plasma concentrations in several preclinical species and human //MAbs. – Taylor & Francis, 2013. – Т. 5. – №. 2. – С. 297-305. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/mabs.23684>

35. Chauhan V. P. et al. Delivery of molecular and nanoscale medicine to tumors: transport barriers and strategies //Annual review of chemical and biomolecular engineering. – 2011. – Т. 2. – С. 281-298. – URL: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114300>

36. Simeon R., Chen Z. In vitro-engineered non-antibody protein therapeutics //Protein & cell. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 3-14. – URL: <https://academic.oup.com/proteincell/article-abstract/9/1/3/6768229>

37. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy //Annual review of pharmacology and toxicology. – 2015. – Т. 55. – С. 489-511. – URL: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654>

38. Shramova E. et al. Dual targeting of cancer cells with DARPIn-based toxins for overcoming tumor escape //Cancers. – 2020. – T. 12. – №. 10. – C. 3014. – URL: <https://www.mdpi.com/860662>
39. Winkler J. et al. EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins EpCAM-Targeted Delivery of siRNA with DARPins //Molecular cancer therapeutics. – 2009. – T. 8. – №. 9. – C. 2674-2683. – URL: <https://aacrjournals.org/mct/article-abstract/8/9/2674/93591>
40. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display //Journal of molecular biology. – 2008. – T. 382. – №. 5. – C. 1211-1227. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283608009650>
41. Binz H. K. et al. Design and characterization of MP0250, a tri-specific anti-HGF/anti-VEGF DARPIn® drug candidate //MAbs. – Taylor & Francis, 2017. – T. 9. – №. 8. – C. 1262-1269. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19420862.2017.1305529>
42. Kramer L. et al. Non-invasive in vivo imaging of tumour-associated cathepsin B by a highly selective inhibitory DARPIn //Theranostics. – 2017. – T. 7. – №. 11. – C. 2806. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5562217/>
43. Bery N. et al. KRAS-specific inhibition using a DARPIn binding to a site in the allosteric lobe //Nature Communications. – 2019. – T. 10. – №. 1. – C. 2607. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10419-2>
44. Vorobyeva A. et al. Comparative evaluation of radioiodine and technetium-labeled DARPIn 9\_29 for radionuclide molecular imaging of HER2 expression in malignant tumors //Contrast Media & Molecular Imaging. – 2018. – T. 2018. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/cmami/2018/6930425/>
45. Larkina M. et al. Development of highly specific radiochemical compounds based on 99-M Tc-labeled recombinant molecules for radionuclide imaging of malignancies overexpressing HER-2/neu. – 2017. – URL: <https://vital.lib.tsu.ru/vital/access/manager/Repository/vtls:000632274>

46. Deyev S. et al. Comparative evaluation of two DARPin variants: effect of affinity, size, and label on tumor targeting properties //Molecular pharmaceutics. – 2019. – T. 16. – №. 3. – C. 995-1008. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00922>
47. Waibel R. et al. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc (I)-carbonyl complex //Nature biotechnology. – 1999. – T. 17. – №. 9. – C. 897-901. – URL: [https://www.nature.com/articles/nbt0999\\_897](https://www.nature.com/articles/nbt0999_897)
48. Tolmachev V. et al. HEHEHE-tagged affibody molecule may be purified by IMAC, is conveniently labeled with [99mTc (CO) 3]+, and shows improved biodistribution with reduced hepatic radioactivity accumulation //Bioconjugate chemistry. – 2010. – T. 21. – №. 11. – C. 2013-2022. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc1002357>
49. Vorobyeva A. et al. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of 99mTc-labeled DARPin G3 //Scientific Reports. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 9405. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-45795-8>
50. Bragina O. et al. Phase I trial of 99mTc-(HE) 3-G3, a DARPin-based probe for imaging of HER2 expression in breast cancer //Journal of Nuclear Medicine. – 2022. – T. 63. – №. 4. – C. 528-535. – URL: <https://jnm.snmjournals.org/content/63/4/528.abstract>
51. Liu S., Chakraborty S. 99m Tc-centered one-pot synthesis for preparation of 99m Tc radiotracers //Dalton Transactions. – 2011. – T. 40. – №. 23. – C. 6077-6086. – URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/dt/c0dt01462a>
52. Wällberg H. et al. Molecular design and optimization of 99mTc-labeled recombinant affibody molecules improves their biodistribution and imaging properties //Journal of Nuclear Medicine. – 2011. – T. 52. – №. 3. – C. 461-469. – URL: <https://jnm.snmjournals.org/content/52/3/461.short>

53. Garousi J. et al. Comparative evaluation of tumor targeting using the anti-HER2 ADAPT scaffold protein labeled at the C-terminus with indium-111 or technetium-99m //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-11. – URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1038/s41598-017-15366-w.pdf>

54. Oroujeni M. et al. Preclinical evaluation of <sup>99m</sup>Tc-ZHER2: 41071, a second-generation affibody-based HER2-visualizing imaging probe with a low renal uptake //International journal of molecular sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 5. – С. 2770. – URL: <https://www.mdpi.com/1027304>

55. Schaffer P. et al. Direct production of <sup>99m</sup>Tc via <sup>100</sup>Mo (p, 2n) on small medical cyclotrons //Physics Procedia. – 2015. – Т. 66. – С. 383-395. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875389215002011>

56. Malakhov M. P. et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins //Journal of structural and functional genomics. – 2004. – Т. 5. – №. 1-2. – С. 75. – URL: [https://www.academia.edu/download/50455315/SUMO\\_fusions\\_and\\_SUMO-specific\\_protease\\_20161121-28984-1qg9dki.pdf](https://www.academia.edu/download/50455315/SUMO_fusions_and_SUMO-specific_protease_20161121-28984-1qg9dki.pdf)

57. Wällberg H., Orlova A. Slow internalization of anti-HER2 synthetic affibody monomer <sup>111</sup>In-DOTA-ZHER2: 342-pep2: implications for development of labeled tracers //Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals. – 2008. – Т. 23. – №. 4. – С. 435-442. – URL: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/cbr.2008.0464>

58. Larkina M. et al. Comparative Preclinical Evaluation of Peptide-Based Chelators for the Labeling of DARPIn G3 with <sup>99m</sup>Tc for Radionuclide Imaging of HER2 Expression in Cancer //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 21. – С. 13443. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/21/13443>

59. Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 19.12.2022, с изм. от 11.04.2023); дата введения 2002-02-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/901807664?section=text> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

60. ГОСТ 12.0.003-2015 ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация; дата введения 2017-03-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200136071> (дата обращения: 01.05.2023).

Текст: электронный

61. СП 61.13330.2012. Свод правил. Тепловая изоляция оборудования и трубопроводов: дата введения 2013-01-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200091050> (дата обращения: 01.05.2023). Текст:

электронный

62. ГОСТ 12.1.019-2017. Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты: дата введения 2019-01-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200161238> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

63. СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания"; дата введения 2021-03-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/573500115?section=status> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

64. Р 2.2.2006-05 Гигиена труда. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда: дата введения 2005-11-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200040973?section=text> (дата обращения 01.05.2023). Текст: электронный;

65. ГОСТ 12.1.003-2014 Система стандартов безопасности труда. Шум. Общие требования безопасности; дата введения 2015-11-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200118606> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

66. Приказа Минтруда России № 33н "Об утверждении Методики проведения специальной оценки условий труда, Классификатора вредных и (или) опасных производственных факторов, формы отчета о проведении специальной оценки условий труда и инструкции по ее заполнению" от 24

января 2014 года с изменениями на 27 апреля 2020 года; дата введения 2020-09-01. URL:

<https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=369213> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

67. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95\* (с Изменением N 1): дата введения 2017-05-08. – URL:

<https://docs.cntd.ru/document/456054197?section=text> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

68. СанПиН 2.6.1.2523-09 Нормы радиационной безопасности; дата введения: 2009-09-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/902170553> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

69. ГОСТ 12.2.003-91 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности. Актуализирован 06.04.2015\*; дата введения 1992-01-01. URL: <https://rags.ru/gosts/gost/574/> (дата обращения 01.05.2023). Текст: электронный;

70. СП 2.2.3670-20 Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда; дата введения 2021-01-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/573230583?marker=6560Ю> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

71. СП 60.13330.2020. Свод правил. Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха. СНиП 41-01-2003" (утв. и введен в действие Приказом Минстроя России от 30.12.2020 N 921/пр); дата введения 2021-07-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/573697256?marker=7D20K3> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

72. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03 Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов (с изм. от 28.02.2022): дата введения 2021-07-01. – URL:

<https://docs.cntd.ru/document/902065388> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

73. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (с Изменением N 1): дата введения 1989-01-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200003608?section=text> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

74. ГОСТ 17.1.3.06-82 Охрана природы (ССОП). Гидросфера. Общие требования к охране подземных вод: дата введения 1983-01-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200004387> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

75. ГОСТ 17.1.3.13-86 Охрана природы (ССОП). Гидросфера. Общие требования к охране поверхностных вод от загрязнения: дата введения 1986-07-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200003200> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный.

76. ГОСТ Р 53692-2009 Ресурсосбережение. Обращение с отходами. Этапы технологического цикла отходов: дата введения 2011-01-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200081740> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный.

77. СП 12.13130.2009 Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности; дата введения 2009-05-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200071156> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

78. СП 2.13130.2020. Свод правил. Системы противопожарной защиты. Обеспечение огнестойкости объектов защиты: дата введения 2020-09-12. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/565248963> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный.

79. N 123-ФЗ от 22.07.2008 (ред. от 01.03.2023) Технический регламент о требованиях пожарной безопасности: дата введения 2023-03-01.

– URL: <https://docs.cntd.ru/document/902111644> (дата обращения: 01.05.2023).

Текст: электронный.

80. Федеральный закон от 21.07.2014 N 219-ФЗ. Об охране окружающей среды: дата введения 2002-01-10. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/901808297?marker=64U0IK> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный.

81. СП 61.13330.2012. Свод правил. Тепловая изоляция оборудования и трубопроводов: дата введения 2013-01-01. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200091050> (дата обращения: 01.05.2023). Текст: электронный;

# ПРИЛОЖЕНИЕ А

## Раздел 1 Аналитический обзор на английском языке

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Фоминых Анастасия Сергеевна		

Консультант ИШХБМТ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Плотников Е.В.	к.х.н.		

Консультант – лингвист отделения (НОЦ) школы ШБИЦ

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Гончарова Л.А.	к.пед.н.		

## 1 Literary review

### 1.1 Receptor tyrosine kinases

The study of the process of carcinogenesis is crucial for understanding the nature of tumor initiation and development, as well as for finding new and effective cancer therapies. Receptor tyrosine kinases (RTKs) (Figure 1), which are metabotropic cellular receptors, have been shown to perform not only a key function in the regulation of normal cellular processes, but also to play a critical role in the initiation and development of malignant tumors. Mutations in RTK lead to the activation of a cascade of reactions that have many different effects on protein expression.

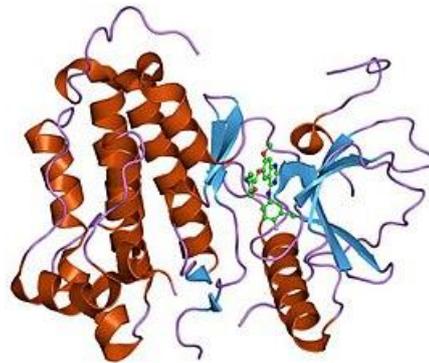


Figure 1 - General structure of receptor tyrosine kinases

The involvement of RTK in cellular dysfunction leading to cancer, fibrosis, degenerative and cardiovascular diseases has made receptor tyrosine kinases an attractive target for drug treatment of such diseases. For example, the monoclonal antibody trastuzumab (Figure 2), the active ingredient in the drug Herceptin, can bind to the extracellular domain of the receptor tyrosine kinase HER2, inhibiting downstream signaling pathways and thus blocking the proliferation of human tumor cells overexpressing HER2.

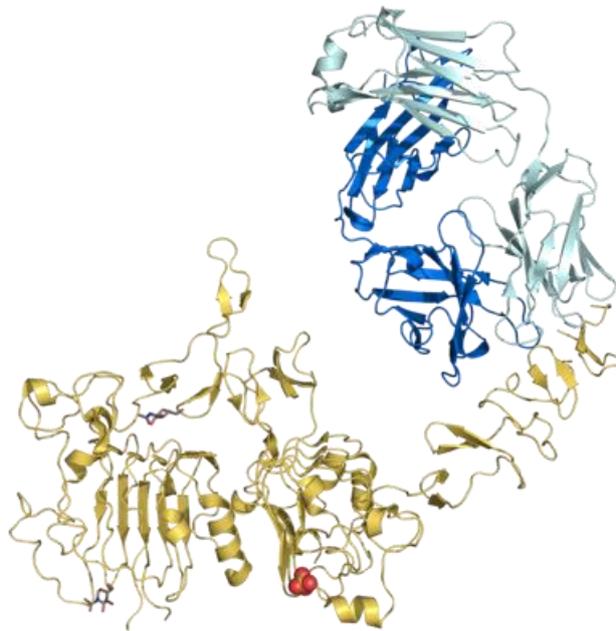


Figure 2 - Trastuzumab (blue) bound to HER2 (gold)

Receptor tyrosine kinases include many families, such as the fibroblast growth factor receptor (FGFR) family, the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) family, etc.

The first discovered RTKs were the human epidermal growth factor ERBB family of proteins. This family includes four different receptor tyrosine kinases: HER1 (EGFR1, ErbB-1), HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3), and HER4 (ErbB-4) (Figure 3), similar in structure and sequence glycoproteins associated with the surface of epithelial and mesenchymal cell membranes. Each of these proteins contains an extracellular ligand-binding domain, a transmembrane domain and an intracellular tyrosine kinase domain [5, 6]. 11 extracellular ligands specific to epidermal growth factor receptors are known for the ERBB family, with the exception of HER2 - no ligand is currently known to bind directly to HER2. Ligand binding to the extracellular domain of ErbB leads to dimerization (homo- or hetero-) of ErbB with other receptors of the family in various combinations, which indicates autophosphorylation of the intracellular domain of tyrosine kinase. The phosphorylated residues serve as binding sites for adaptor and scaffold proteins that activate multiple downstream signaling pathways, for example, PI3K/AKT - one of the universal intracellular signaling pathways of human cells

that is responsible for growth, metabolism, cell proliferation, and escape from apoptosis - and others such as Ras/MEK/ERK, PLC $\gamma$ /PKC and JAK/STAT. Signaling pathways activated by the ERBB family are responsible for regulation of cell survival, differentiation, proliferation, invasion, adhesion and other processes. In addition, the role of these pathways in enhancing the expression of genes that activate epithelial-mesenchymal transition, a key process of migration and invasion of cancer cells leading to the formation of metastases, is known [7]. The efficiency and outcome of activated signaling cascades are determined by specific ligands, dimeric ERBB complexes and proteins that bind to phosphorylated tyrosine residues in the C-terminal tail of ERBB receptors [8].

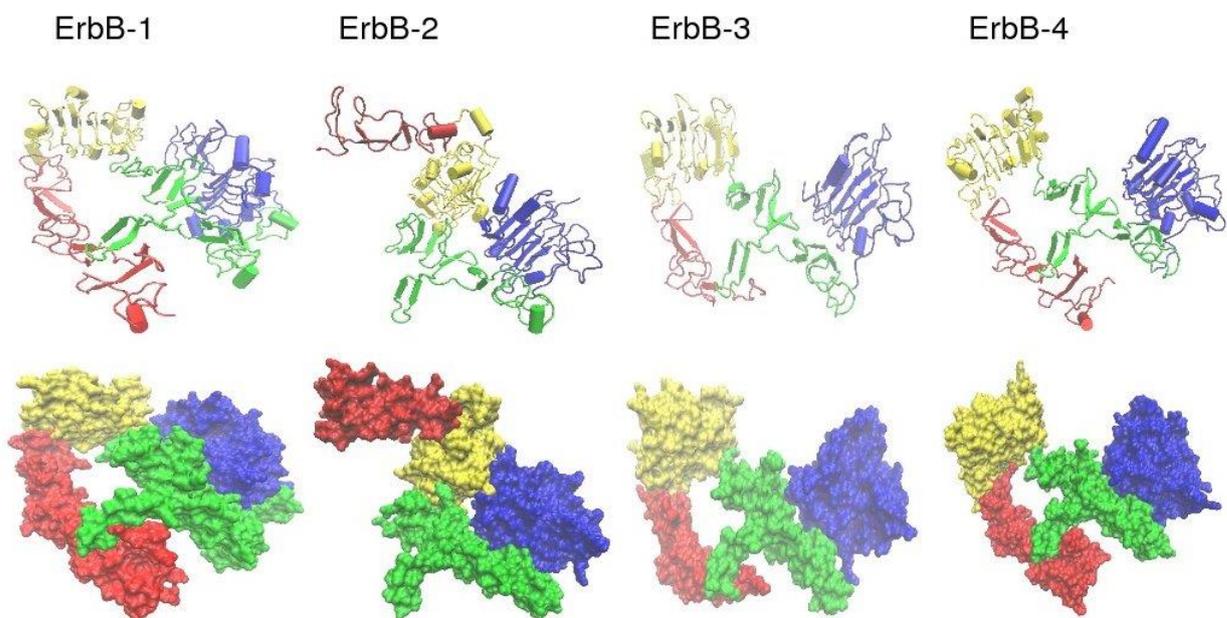


Figure 3 - Three-dimensional structure of ErbB proteins

Disturbances in ERBB signaling are associated with the occurrence of various diseases. Thus, in the case of insufficient transmission, the development of neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis and Alzheimer's disease is observed. In case of excessive transmission, a wide range of malignancies can be observed. ErbB-1 and ErbB-2 are found in many human cancers.

1.1.2. Receptor tyrosine kinase of the human epidermal growth factor protein family HER2

In recent years, the receptor tyrosine kinase ErbB-2, or HER2, has become one of the most important biomarkers and therapeutic targets (Figure 4).

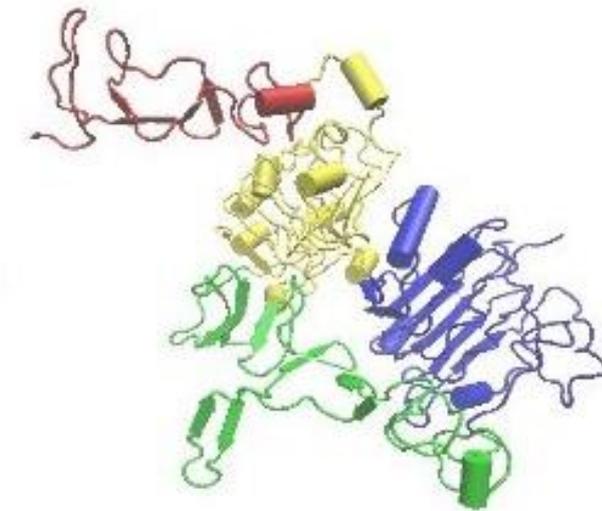


Figure 4 - Structure of the HER2 receptor tyrosine kinase

In humans, the ErbB-2 protein is encoded by the ERBB gene, a proto-oncogene located on the long arm of human chromosome 17 (17q12). In the case of tumor development, point mutations are often found in the HER2 gene structure that affect both extracellular and transmembrane sites of HER2, activating this receptor independently of the ligand. For example, replacing valine with glutamine or glutamic acid in the transmembrane domain can lead to dimerization of HER2. The frequency of ERBB mutations varies in different tumor types. These mutations are most common in non-small cell lung cancer (10% to 35%) and bladder cancer (10%); there is also evidence of ERBB mutations in the diagnosis of breast, gastric, and endometrial cancer, and almost always these mutations are identified in the absence of ERBB amplification.

ERBB amplification is observed in 15 - 30% of breast cancers. In addition to breast cancer, overexpression is found in aggressive forms of uterine cancer, adenocarcinomas of the stomach (7 - 34%), lung, ovary, and in 30% of salivary gland carcinomas, which proves the involvement of HER2 in oncogenesis.

The main difference between HER2 and other receptors in the ERBB family is that it does not bind directly to any currently known ligand. The role of ligands for binding to HER2 in HER2-mediated activation of signaling pathways is

played by other ERBB receptors, leading to heterodimerization heterodimerization, or activation occurs through homodimerization with other HER2 receptors in case of their high concentration on the cell membrane, which occurs, for example, in cancer [9, 10]. Activated by other ERBB members, HER2 initiates downstream reaction cascades similar to EGFR.

The most preferred partner for HER2 dimerization is ErbB-3, or HER3. Among all ERBB pairs, the HER2/ERBB3 heterodimer is the most potent activator of the PI3K/AKT signaling cascade by binding the p85 subunit of PI3K to ERBB3 [11]. In addition, ERBB3 is consistently phosphorylated in human breast cancer tissues induced by HER2 amplification [12]. Suppression of ERBB3 inhibits the viability of breast cancer cells overexpressing HER2: ERBB3-expressing xenografts with HER2 amplification have been shown to undergo rapid regression [12]. Similarly, an ERBB3 neutralizing antibody was also effective in reducing the growth of human breast cancer xenografts with HER2 amplification [13]. All these results indicate an essential role of ERBB3 in HER2-mediated oncogenic signaling.

In [14], 13 HER2 mutations in breast cancer independent of HER2 gene amplification were characterized, finding that some of them were sensitive to HER2-targeting therapy. These data provided critical preclinical results suggesting that existing HER2-targeting drugs are feasible for the treatment of breast cancer patients with HER2 mutations [14].

### **1.1.2 Existing HER2-targeted cancer therapies**

Several HER2-targeted treatments for breast cancer have been approved or transferred to clinical trials by the Food and Drug Administration (FDA) to date. These include monoclonal antibody therapeutics (mCATs) such as trastuzumab (Herceptin®), pertuzumab (Perjeta®) and trastuzumab emtansine (Cadsila®), and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as lapatinib (Tykerb®) and neratinib (in clinical trials) [15].

The recombinant humanized monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin), which targets the extracellular domain of HER2, was the first targeted

therapy approved by the Food and Drug Administration in 1998 for the treatment of breast cancer [16]. Pertuzumab prevents dimerization of HER2 by other ERBB/HER receptors, in particular by the most potent HER2/HER3 signaling heterodimer [17]. Trastuzumab emtansine (T-DM1) is an antibody-drug conjugate that combines trastuzumab and the microtubule inhibitory cytotoxic agent emtansine [18]. Lapatinab is a reversible ATP-competitive tyrosine kinase inhibitor against EGFR and HER2, whereas neratinib is an irreversible ATP-competitive inhibitor of the receptor tyrosine kinases ERBB, EGFR, HER2 and ERBB4 [19, 20].

Trastuzumab, which is considered to be the standard of treatment for patients with early and metastatic breast cancer accompanied by HER2 overexpression, inhibits HER2 ectodomain cleavage, blocks ligand-independent HER2-containing dimers, activates antibody-dependent cellular cytotoxicity and induces HER2 internalization and degradation [21, 22].

Although trastuzumab significantly improved outcome of patients with breast cancer, resistance to trastuzumab has also been observed. Several mechanisms have been shown to contribute to trastuzumab resistance. Among them are:

1. Constitutive activation of the downstream PI3K pathway due to inactivation or loss of the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN) or mutations in the PI3KCA gene [23, 24];

2. Src-kinase activation caused by PTEN deficiency [25];

3. Overexpression of other RTKs, such as other EGFR family receptors, insulin-like growth factor receptor 1, hepatocyte growth factor receptor (c-Met), and ephrin receptor EphA2 [26-29];

4. Intrinsic alterations of HER2, such as alternative translation initiation, splicing variants, and mutations;

5. Proteolytic isolation of full-length HER2, which generates a shortened form of HER (p95HER2) lacking the trastuzumab-binding domain [30].

Another potential mechanism of trastuzumab resistance is mucin-4 binding to the extracellular domain of HER2, which masks the trastuzumab binding site on HER2 [31]. Other mechanisms contributing to trastuzumab resistance include defects in the apoptosis mechanism, elevated levels of the apoptosis protein inhibitor, survivin, and changes in cell cycle control [15]. Various combination therapies, including combinations of MAB and ITK, have been evaluated in clinical trials to combat resistance [15].

### **1.2 Advantages of alternative scaffold proteins**

Currently, one of the main methods of cancer therapy are methods using monoclonal antibodies (MAB). A number of drugs are currently on the market that are successfully used in the treatment of cancer or are in the clinical trial phase. This success in the use of MAB is due to the fact that MAB can be selected to bind to almost any given target with high affinity and specificity, thereby exhibiting neutralizing or cytotoxic functions with very limited side effects [32, 33]. However, MAB are not without some serious drawbacks: their large size and high molecular weight greatly reduce penetration into both normal tissues and solid tumors; the need for production in mammalian cells leads to high production costs; the presence of the antibody constant can lead to undesirable effects, in particular to their toxicity and increased circulation time in blood [34-36].

An example of such antibody-based drugs is trastuzumab, known under the brand named Herceptin®, which is patented and widely used in the treatment of breast and stomach cancer. Despite the clear benefits of the drug, namely increased survival of patients in both early and late stages of cancer and reduced risk of relapse, the cost of trastuzumab is quite high and it also has a number of serious side effects, which include heart failure and lung disease, among others. In addition, as described above, some patients are resistant to trastuzumab, which occurs in 15% to 25% of cases.

Thanks to the development of *in vitro* selection technologies such as phage display, ribosomal display, and yeast display, linking genotype (protein gene sequence) and phenotype (ability to bind to the target), it became possible to select

specific binders without immunization involvement. This initiated the development of various alternative scaffold proteins capable of overcoming the drawbacks of MAB. Such proteins have a constant "carcass" part and variable sites whose amino acid sequence can be changed without changing the spatial structure of the whole protein [37]. Alternative scaffold proteins have a number of advantages over antibodies: their low molecular weight allows them to penetrate into tissues quickly and efficiently and to be just as quickly eliminated from healthy tissues, specifically accumulating in tumors, the absence of the constant part of antibodies neutralises cytotoxic effects, high stability allows their storage at room temperature without losing activity, and the ease of production in microorganisms significantly reduces their production cost. Examples of such proteins are affibodies, monobodies, anticalins, and darpins.

### **1.2.1 Designed ankyrin repeat proteins DARPins**

DARPins, or darpins - designed ankyrin repeat proteins - are engineered scaffold proteins with ankyrin repeats. The carcass of darpins consists of natural ankyrin proteins, a family of proteins that is responsible for cell signaling, regulation and structural integrity of the cell. As a rule, darpins consist of 4-5 repeats, of which the first (N-terminal motif) and the last (C-terminal motif) shield the hydrophobic core of the protein from the aquatic environment (so called capping repeats). Each motif consists of 33 amino acids and includes a  $\beta$ -fold and two antiparallel  $\alpha$ -helices (Fig. 5). Cysteine (to avoid disulfide bonds), glycine, and proline are absent from the amino acid sequence of the carcass part of darpins (because some amino acids are part of the  $\alpha$ -helices). The absence of cysteine in the carcass of the molecule makes it possible to increase site-specific binding by adding site-specific cysteine to the end motifs of the protein. Non-proteinogenic amino acids can also be added to the end motifs for the same purpose [38].

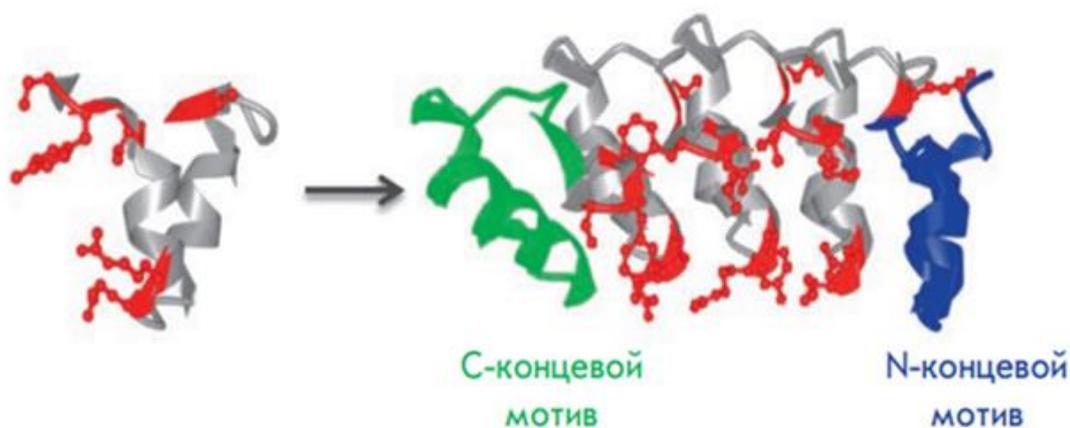


Figure 5 - The general structure of a darpin with five motifs

To create a stable tertiary structure, at least three repetitions are required, i.e., one internal repetition and two capping repetitions.

The molecular weight of the majority of darpins is in the range of 14 - 18 kDa, they are characterized by high enough for protein molecules thermal stability (melting temperature can reach 90 °C), as well as resistance to proteases and denaturing agents. High activity and affinity make darpins active at low concentrations, which, in combination with radionuclides for cancer diagnosis, allows to reduce the dose load on the patient and medical personnel.

Darpins are expressed in the cytoplasm of *Escherichia coli* in high yield (more than 10 g/l in fermentation, 1 g/l in flask) in a soluble form.

The principle of darpins allows proteins to be modified to provide specificity to specific biological targets. Thanks to this, darpins have been created that bind to various molecules, for example, molecules involved in oncogenesis: EpCAM [39], EGFR [40], VEGF, HGF [41], cathepsin B [42], KRAS [43], etc. High specificity and affinity to the selected biological targets allows the use of darpins as probes for nanoparticle delivery, in targeted photodynamic therapy, in cancer diagnostics, as well as for the creation of oncolytic viruses and chimeric antigen receptors.

It is known that darpins can be successfully conjugated with radionuclides with high radiochemical purity and yield, which makes them promising agents for noninvasive radionuclide diagnostics. For example, in studies [44, 45], darpin 9\_29

molecules labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{125}\text{I}$  demonstrated high sensitivity and specificity of the compounds to Her2/neu receptors, both *in vitro* and *in vivo*.

The initial development of DARPIn-based imaging probes labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  was based on the use of technetium tricarbonyl nucleus ( $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ) in combination with a chelator based on a hexahistidine-containing peptide (histidine tags or His<sub>6</sub>-tags) [46, 47]. An attractive feature of this approach is that histidine tags can be used not only for stable technetium labeling of proteins, but also for their purification by affinity chromatography of immobilized metal ions after recombinant production [42]. While these indicators demonstrated good visualization of HER2-expressing xenografts, their high accumulation in the liver was observed. In work using other scaffold proteins, affibody molecules, it was found that replacement of every second histidine in His<sub>6</sub>-tag with glutamate leads to formation of (HE)<sub>3</sub>-tag [48]. This also allows stable labeling using the  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  core, but provides significantly lower liver uptake [49]. Evaluation of this tag demonstrated that positioning at the N-terminus of the HER2-targeted DARPIn G3 leads to a threefold reduction in liver uptake compared to that of other variants containing His<sub>6</sub>-tag [50]. This variant, designated  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{HE})_3\text{-G3}$  (Figure 6), was evaluated in a phase I clinical trial [51]. Clinical data demonstrated that injections of  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{HE})_3\text{-G3}$  were safe and provided a low dose burden to patients. Imaging using  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{HE})_3\text{-G3}$  allowed us to distinguish between HER2-positive and HER2-negative breast cancer tumors.

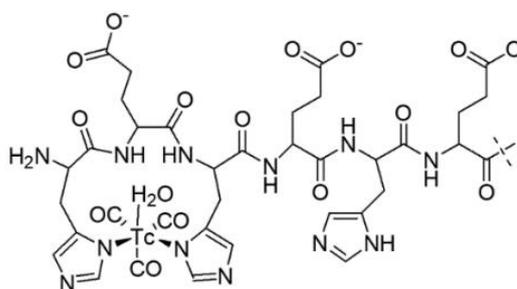


Figure 6 - Schematic representation of the complex  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{HE})_3\text{-G3}$



Figure 7 - Position [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-(HE) $_3$ -G3 on the N-terminus of DARPin G3

One disadvantage of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-(HE) $_3$ -G3 to advance to the clinical trial stage is the use of a two-step labeling procedure that involves conversion of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-pertechnetate to [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc(CO) $_3^+$ -core and subsequent conjugation of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc(CO) $_3^+$  to the target DARPin. Another problem is the need for gel-exclusion chromatography to purify the labeled [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-(HE) $_3$ -G3 from the components of the reaction mixture. It seems that the development of a one-step labeling procedure that would not require purification would make labeling more reliable and simplify clinical implementation [52]. Experience in labeling affibody molecules and ADAPTs suggests that this can be achieved by using a chelator based on a cysteine-containing peptide placed on the C-terminus of a framed protein [53-55]. In this case, the chelator SN $_3$  is formed by the thiol group of cysteine and the amino acid amide nitrogen located at the N-terminus (Fig. 2). It is important to note that the choice of amino acids in such chelators affects the intracellular retention of  $^{99m}\text{Tc}$  after internalization of the target protein by cells in tumors and in normal tissue. The use of charged amino acids, such as glutamate or lysine, leads to the formation of so-called residue tags, that is, they provide a strong intracellular retention of activity [53]. They provide improved intracellular retention of cancer cell activity, but also increase renal retention in case of renal reabsorption. In addition, inclusion of glutamates decreased liver uptake of affibody molecules, but this effect should be compared with increased intracellular retention of activity in the liver. Variants containing glycine and serine did not accumulate, i.e., they diffuse from the cells after proteolytic degradation of the target proteins in lysosomes

This reduces the retention of  $^{99m}\text{Tc}$  in the kidneys and liver. Thus, the choice of an optimal chelator based on a cysteine-containing peptide can provide the highest possible activity uptake in tumors and the lowest possible uptake in normal tissues, i.e., improve image contrast.

### **1.3 Technetium-99m as an optimal radioisotope for radioisotope diagnostics**

Radioisotopes are now widely used in medicine. Nuclear medicine consumes more than half of the radioactive isotopes, of which 46% are used in cardiology, 34% in oncology and 10% in neurology.

Technetium-99m isotope is widely used in radioisotope diagnostics. Technetium-99m in radiopharmaceuticals is used to diagnose with gamma cameras malignancies of thyroid and salivary glands, brain, stomach, various diseases of cardiovascular system, lungs, liver, etc. Ninety-four percent of technetium-99m, a short-lived isotope with a half-life of 6 hours, decays to technetium-99 over 24 hours. Given its biological half-life (24 h), its use allows fast scanning procedures while not exposing the patient and medical personnel to high doses. However, the same properties make this radionuclide unsuitable for therapeutic use [54].

Another advantage of  $^{99m}\text{Tc}$  is its fast, efficient, and relatively inexpensive synthesis from technetium generators, which occurs according to the scheme shown in Figure 8. 88% of the initial molybdenum-99 undergoes  $\beta$ -decay to technetium-99m, allowing a high yield of the necessary  $^{99m}\text{Tc}$  without a large amount of accompanying metal impurities and other radionuclides and elements.

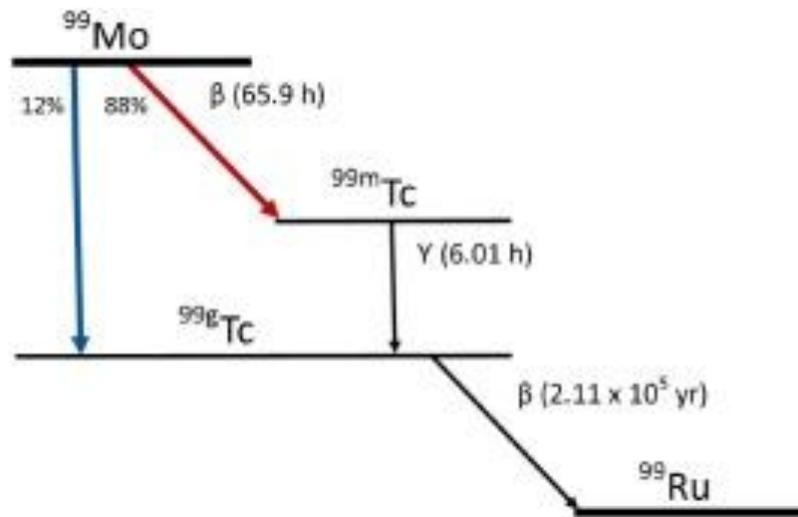


Figure 9 - Schematic of the reaction of obtaining  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  from  $^{99}\text{Mo}$  in technetium-99m generators

In addition to sufficiently low cost and efficient synthesis of the target product, the initial radionuclide  $^{99}\text{Mo}$  has a half-life of 66 h, which provides the possibility of prompt delivery of generators to medical institutions, including over long distances.

All these advantages make  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  valuable and promising for medical applications, as well as for the search for new therapeutic and diagnostic methods.