

Заключение

В настоящей работе получены многокомпонентные керамические твердые растворы методов горячего прессования. Была определена закономерность образования однофазного твердого раствора (Hf,Zr,Ti,Nb)C с решеткой ГЦК по типу NaCl из эквимольной смеси HfC-ZrC-TiC-NbC. Установлено, что формирование (Hf,Zr,Ti,Nb)C протекает через образование двух- и трехкомпонентного твердых растворов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ye B, et al. First-principles study, fabrication and characterization of (Zr_{0.25}Nb_{0.25}Ti_{0.25}V_{0.25})C highentropy ceramics // Acta Materialia. 2019, 170. –P. 15–23.
2. Pickering E. et al. Highentropy alloys: A critical assessment of their founding principles and future prospects // International Materials Reviews. - 2016, 61(3). –P. 183–202.
3. Feng L, et al. Synthesis of singlephase high-entropy carbide powders // Scripta Materialia- 2019, 162. –P. 90–93.

Юлдашева Феруза Шерзод кизи (Узбекистан)

Томский политехнический университет, г. Томск

Научный руководитель: Плотников Евгений Владимирович,
канд. хим. наук, доцент

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КАРКАСНЫХ БЕЛКОВ С ХЕЛАТНЫМИ ГРУППАМИ НА ОСНОВЕ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЦИСТЕИНА

Сверхэкспрессия рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2) представляет собой предиктор рака молочной железы [1]. Он сверхэкспрессирован в значительном количестве всех видов рака молочной железы и в меньшей степени также в других типах рака [2]. HER2 представляет собой однопроходный рецептор, закрепленный на плазматической мембране, который принадлежит к семейству рецепторов эпидермального фактора роста. Он может образовывать гомо- или гетеродимеры с другими членами своего семейства, чтобы вызвать активацию. Это приводит к более агрессивному фенотипу, который характеризуется

повышенной пролиферацией, выживаемостью и подвижностью, а также худшим прогнозом для пациента [3].

Для обеспечения таргетной доставки радионуклидов необходимо использовать молекулы, которые связываются исключительно с «таргетным» антигеном для специфической локализации. Также важно отсутствие иммуногенности и стабильность молекулы после мечения [4].

Одним из представителей адресных молекул неиммуноглобулиновой природы является DARPin (Design Ankyrin Repeat Protein), к преимуществам которого относятся небольшой размер (14–20 кДа), стабильная структура, высокая специфичность и аффинность к антигену [5].

Цель. Исследование *in vitro* Исследование нового радиофармацевтического лекарственного препарата на основе каркасных белков с хелатными группами на основе глутаминовой кислоты и цистеина.

Материалы и методы. Сайт-специфическое радиоактивное мечение нового варианта $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}=\text{O}]^+$ с использованием хелатора, содержащий глутаминовую кислоту и цистеин, на основе С-концевой аминокислоты, выполняли с использованием лиофилизированного набора для мечения, содержащий 75 мг дигидрата хлорида олова (II) (Fluka Chemika, Buchs, Швейцария), 5 мг натриевой соли глюконовой кислоты (Celsus Laboratories, Geel, Бельгия) и 100 мкг ЭДТА (Sigma-Aldrich), Дармштадт, Германия) был подготовлен к маркировке. Радиохимический выход для G3-E₃C после очистки составила 98%.

Для оценки специфичности молекулы использовали клетки SKOV-3, SK-BR-3 и PC-3. Клетки высевали в 6-луночные планшеты плотностью $6 \cdot 10^5$ клеток на чашку за сутки до эксперимента. Для каждой клеточной линии использовали два набора чашек. К контрольной группе клеток (3 чашки) добавляли 100-кратный избыток немеченого белка DARPin-G3 (500 мкл) за 30 мин до добавления меченого соединения для насыщения рецепторов HER2. К трем другим чашкам добавляли равный объем полной среды. После этого раствор ^{99m}Tc -меченые DARPins добавляли в каждую чашку до достижения концентрации 1 нМ. Чашки инкубировали при 37 °С 1 ч. После инкубации среду собирали, клетки промывали PBS и эти растворы объединяли. Затем клетки отделяли путем трипсинизации и собирали. Чашки промывали PBS и растворы добавляли к клеточным суспензиям. Активность фракций, содержащих среду или клетки, измеряли с помощью гамма-спектрометра и рассчитывали процент связанной с клетками активности. Эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Клеточный процессинг и интернализация варианта ^{99m}Tc -меченого DARPin G3-E₃C оценивали с использованием клеток SKOV-3. Клетки

(3 чашки на момент времени, 10^6 клеток на чашку) непрерывно инкубировали с $1 \text{ нМ } ^{99\text{m}}\text{Tc}$ -меченых белков при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Во время инкубации интернализированную фракцию периодически определяли методом кислотной промывки. Ассоциированные с мембраной DARPin удаляли из клеток обработкой 4 М раствором мочевины в $0,2 \text{ М}$ глициновом буфере, $\text{pH } 2,0$, в течение 5 мин на льду. Собирали раствор и измеряли его активность. Клеточные остатки, содержащие интернализированные конъюгаты, отделяли обработкой 1 М раствором NaOH в течение 30 мин при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Измеряли радиоактивность во фракциях и рассчитывали процент общей клеточной, мембранной и интернализированной радиоактивности. Чтобы проверить этот протокол для варианта $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -меченого DARPin G3-E₃C, клетки инкубировали на льду (интернализация не должна происходить) в течение 2 часов с мечеными молекулами DARPin, а затем проводили измерение интернализации, как описано выше.

Равновесные константы диссоциации (K_D) определяли с помощью анализа насыщения (оценка аффинности). Для каждой концентрации тестируемого белка готовили набор из четырех чашек для культивирования клеток с клетками SKOV-3. Три чашки использовали для определения специфического связывания, а одну чашку для культивирования клеток использовали для определения неспецифического связывания путем блокирования рецептора. Клетки высевали за сутки до эксперимента. Непосредственно перед измерениями среду удаляли и клетки промывали PBS. Были приготовлены восемь концентраций меченого белка (от $0,2$ до 40 нМ). Каждую контрольную чашку предварительно насыщали 500 мкл немеченого белка в концентрации 2000 нМ . В остальные чашки набора добавляли только среды с сывороткой (тот же объем) и инкубировали клетки во влажном инкубаторе (5 \% CO_2 , $37 \text{ }^\circ\text{C}$) в течение 30 мин . К каждому набору клеток добавляли необходимую концентрацию меченого DARPin ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 мкл на чашку) и инкубировали клетки при $4 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 4 часов . Среду удаляли, клетки промывали PBS ($\times 5$), добавляли раствор трипсин-ЭДТА (500 мкл на чашку) и дополнительно инкубировали в течение 10 мин . Отделившиеся клетки разводили 500 мкл полной среды, ресуспендировали и переносили в пробирки для фракций. Из каждой пробирки отбирали по 40 мкл образца для подсчета клеток. Радиоактивность клеток и стандарты меченого белка измеряли с помощью автоматического гамма-счетчика. Реальные концентрации добавляемого радиоактивно меченого белка рассчитывали для каждой точки данных с использованием самой высокой концентрации. Затем клеточная радиоактивность как $\text{пмоль}/10^5$ клеток для каждого образца.

Результаты. Изучение специфичности *in vitro* варианта ^{99m}Tc -меченого DARPin G3-E₃C продемонстрировало, что связывание с SKOV-3, SK-BR-3 и PC-3 является насыщаемым (специфичным) на высоком уровне и пропорционально уровню экспрессии HER2 в клетках, при этом при блокировании рецепторов избытком немеченого белка отмечается значительное снижение связывания радиокомплексов во всех группах клеток (рисунок 1).

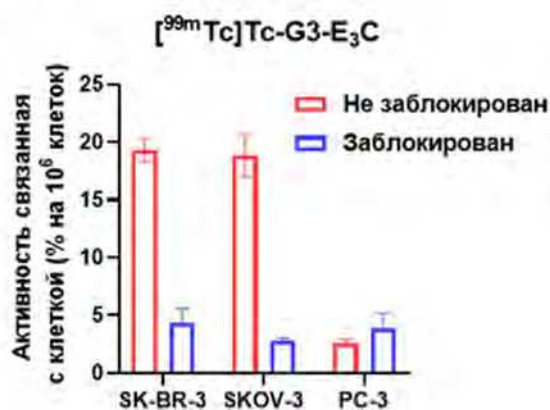


Рис. 1. Результаты определения специфичности связывания

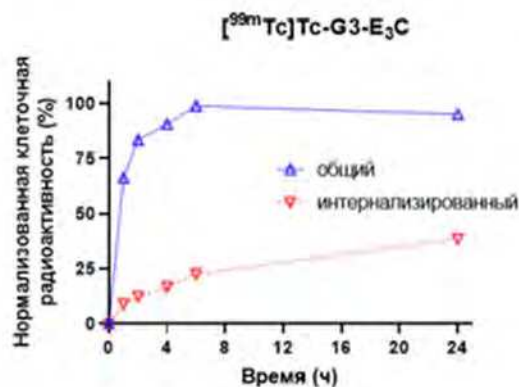


Рис. 2. Результаты определения интернализации в SKOV-3

Результаты интернализации варианта ^{99m}Tc -меченого DARPin G3-E₃C в SKOV-3 показывает, что интернализированная активность постоянно увеличивалась, а выраженного снижения клеточно-ассоциированной активности во время инкубации не наблюдалось. Интернализация происходила достаточно медленно (40 % за 24 часа), что создает предпосылки для эффективного удержания радиоактивной метки внутри опухолевой клетки (рисунок 2).

Оценка аффинности методом насыщения показала, что вариант ^{99m}Tc -меченого DARPin G3-E₃C связывается с рецепторами HER2 на поверхности клеток SKOV-3 с K_D 5,0 нМ, что характеризует данный вариант как высокоаффинный к целевым рецепторам (рисунок 3).

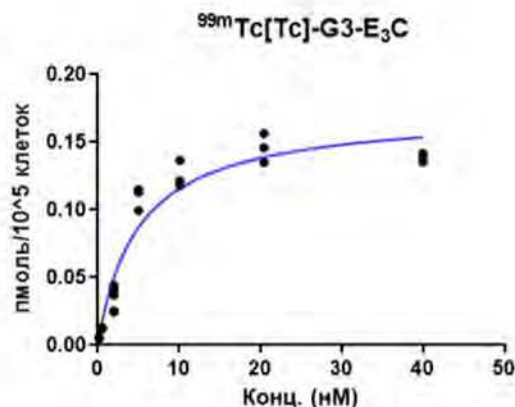


Рис. 3. Определение равновесной константы диссоциации (KD вариант ^{99m}Tc-меченого DARPin G3-E₃C с помощью HER2-экспрессирующих клеток SKOV-3 in vitro

Выводы. Таким образом, исследование in vitro нового таргетного агента на основе ^{99m}Tc и DARPin G3-E₃C имеет предпосылки для перспективности в диагностики опухоли, поскольку имеет хорошую специфичность к опухолевым клеткам, комплекс удерживается в опухоли и не удерживания в здоровых органах и высокоаффинный к целевым рецепторам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Emde A. et al. Therapeutic strategies and mechanisms of tumorigenesis of HER2-overexpressing breast cancer // Critical reviews in oncology/hematology. – 2012. – Т. 84. – С. e49-e57.
2. Yan M. et al. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients // Cancer and Metastasis Reviews. – 2015. – Т. 34. – С. 157-164.
3. Slamon D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // science. – 1987. – Т. 235. – №. 4785. – С. 177-182.
4. Tamaskovic R. et al. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin): from research to therapy // Methods in enzymology. – Academic Press, 2012. – Т. 503. – С. 101-134.
5. Garousi J. et al. Comparative evaluation of affibody molecules for radionuclide imaging of in vivo expression of carbonic anhydrase IX // Molecular pharmaceuticals. – 2016. – Т. 13. – №. 11. – С. 3676-3687.