



Оригинальная статья/Research article

Разработка состава радиофармпрепарата для радионуклидной диагностики злокачественной меланомы

О. Е. Клементьева¹, А. Б. Брускин^{1*}, К. А. Лунёва¹, В. Б. Бубенчиков¹, К. Э. Терновская¹,
А. С. Лунёв¹, Г. Е. Кодина¹

1 – ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России), 123098, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46

*Контактное лицо: Брускин Александр Борисович. E-mail: raphar@mail.ru

ORCID: О. Е. Клементьева – <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>; А. Б. Брускин – <https://orcid.org/0000-0002-0563-9669>; К. А. Лунёва – <https://orcid.org/0000-0002-8392-8343>;
В. Б. Бубенчиков – <https://orcid.org/0000-0002-2348-4269>; К. Э. Терновская – <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>; А. С. Лунёв – <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>;
Г. Е. Кодина – <https://orcid.org/0000-0002-3415-4329>.

Статья поступила: 21.07.2020. Статья принята в печать: 19.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В 2018 году в России меланома вышла на одну из лидирующих позиций по числу больных с впервые установленным диагнозом злокачественного новообразования. Данная форма рака кожи обладает высокой степенью злокачественности и стремительным прогрессирующим, что приводит к самым тяжелым последствиям. Применение методов ядерной медицины необходимо на стадиях уточнения диагноза, поиска удаленных метастазов и контроля хода лечения. Работа посвящена одному из этапов разработки радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) для диагностики злокачественной меланомы и её метастазов на основе синтетического аналога α -меланоцитстимулирующего гормона (САГ) и радионуклида Tc-99m.

Цель. Выбор оптимальных условий получения комплексного соединения САГ · ^{99m}Tc и изучение в экспериментах *in vitro* возможности использования его в качестве диагностического средства.

Материалы и методы. Проведена экспериментальная работа по оптимизации условий получения комплексного соединения САГ · ^{99m}Tc. Изучены связывание и интернализация этого соединения клетками меланомы линии V16-F0.

Результаты и обсуждение. Получены результаты меченая САГ радионуклидом ^{99m}Tc в широком диапазоне условий, как прямым методом, так и с использованием промежуточного комплекса. Целевое соединение быстро связывается с клетками меланомы V16-F0. Степень интернализации более 85 %.

Заключение. По результатам химических опытов и данных экспериментов *in vitro* найдены оптимальные условия получения комплексного соединения САГ · ^{99m}Tc с радиохимическим выходом более 90 %. Подтверждены специфичность и рецепторный механизм связывания изученного соединения с клетками меланомы.

Ключевые слова: злокачественная меланома, меланоцитстимулирующий гормон, Tc-99m, оптимизация, V16-F0.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. О. Е. Клементьева, А. Б. Брускин и Г. Е. Кодина обосновали актуальность исследования и разработали модель эксперимента, В. Б. Бубенчиков и А. Б. Брускин выполнили экспериментальные радиохимические работы. К. А. Лунёва и К. Э. Терновская выполнили эксперименты с культурами клеток и участвовали в обработке полученных данных совместно с А. С. Лунёвым. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании и написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена в рамках Госконтракта № 14.N08.12.0032 программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности РФ на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Для цитирования: Клементьева О. Е., Брускин А. Б., Лунёва К. А., Бубенчиков В. Б., Терновская К. Э., Лунёв А. С., Кодина Г. Е. Разработка состава радиофармпрепарата для радионуклидной диагностики злокачественной меланомы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-66-71>

Development of Radiopharmaceutical Composition for Radionuclide Diagnostics of Malignant Melanoma

Olga E. Klementyeva¹, Alexander B. Bruskin^{1*}, Kristina A. Lunyova¹, Viktor B. Bubenshchikov¹,
Kristina E. Ternovskaya¹, Aleksandr S. Lunev¹, Galina E. Kodina¹

1 – State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency (SRC – FMBC), 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia

*Corresponding author: Aleksandr B. Bruskin. E-mail: raphar@mail.ru

ORCID: Olga E. Klementyeva – <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>; Alexander B. Bruskin – <https://orcid.org/0000-0002-0563-9669>;
Kristina A. Lunyova – <https://orcid.org/0000-0002-8392-8343>; Viktor B. Bubenshchikov – <https://orcid.org/0000-0002-2348-4269>;
Kristina E. Ternovskaya – <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>; Aleksandr S. Lunev – <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>;
Galina E. Kodina – <https://orcid.org/0000-0002-3415-4329>.

Received: 21.07.2020. Revised: 19.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Skin cancers came first in Russia in numbers of oncological diseases. Melanoma, making up only a small part of these cases, leads to the most serious consequences. The nuclear medicine methods application is necessary at the stages of clarifying the diagnosis, searching for remote metastases and the treatment monitoring. The work is devoted to one of the stages of the radiopharmaceutical development for the diagnostics of malignant melanoma and its metastases based on the synthetic analog of α -melanocyte stimulating hormone (SAH) and radionuclide Tc-99m.

© Клементьева О. Е., Брускин А. Б., Лунёва К. А., Бубенчиков В. Б., Терновская К. Э., Лунёв А. С., Кодина Г. Е., 2020

© Klementyeva O. E., Bruskin A. B., Lunyova K. A., Bubenshchikov V. B., Ternovskaya K. E., Lunev A. S., Kodina G. E., 2020

Aim. The selection of optimal conditions for the preparation of the SAH · ^{99m}Tc complex and the study of the using possibility it as a diagnostic tool in *in vitro* experiments.

Materials and methods. Experimental work was carried out to optimize the conditions for obtaining the complex compound SAH · ^{99m}Tc. The binding and internalization of this compound by B16-F0 melanoma cells has been studied.

Results and discussion. The results of labeling SAH with a ^{99m}Tc radionuclide under a wide range of conditions were obtained both by the direct method and using the intermediate complex. The target compound rapidly binds to B16-F0 melanoma cells. The degree of internalization is more than 85 %.

Conclusion. Based on the results of chemical experiments and data from *in vitro* experiments, optimal conditions for obtaining a complex compound SAH · ^{99m}Tc with a radiochemical yield of more than 90 % were found. The mechanism of binding of this compound to malignant melanoma cells has been established.

Keywords: malignant melanoma, melanocyte-stimulating hormone, technetium-99m, optimization.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Olga E. Klementyeva, Alexander B. Bruskin and Galina E. Kodina justified the relevance of the study and developed a model of the experiment, Viktor B. Bubenshchikov and Alexander B. Bruskin performed experimental radiochemical work. Kristina A. Lunyova and Kristina E. Ternovskaya performed experiments with cell cultures and participated in the processing of the data obtained together with Aleksandr S. Lunev. All authors participated in the discussion of the results and in writing the text of the article.

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the State Contract No. 14.N08.12.0032 of the program «Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond».

For citation: Klementyeva O. E., Bruskin A. B., Lunyova K. A., Bubenshchikov V. B., Ternovskaya K. E., Lunev A. S., Kodina G. E. Development of radiopharmaceutical composition for radionuclide diagnostics of malignant melanoma. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-66-71>

ВВЕДЕНИЕ

В 2018 году в России меланома вышла на одну из лидирующих позиций по числу больных с впервые установленным диагнозом злокачественного новообразования [1]. И хотя меланома составляет лишь примерно 1/8 случаев рака кожи, именно она приводит к самым тяжелым последствиям [2]. При этом смертность от меланомы растет на фоне снижения стандартизованного показателя [3]. Конечно, ранняя диагностика меланомы возможна и без применения высокотехнологичных методов, к которым относятся и ядерная медицина. Однако на стадии уточнения диагноза, поиска отдаленных метастазов и контроля лечения методы ядерной медицины крайне необходимы. Применение основного радиофармпрепарата ПЭТ-диагностики – 2-[¹⁸F]фтордезоксиглюкозы – было достаточно успешным в некоторых случаях, однако способность этого препарата накапливаться не только в опухолевых очагах, но и в очагах воспаления очень часто значительно затрудняет диагностику. Другой подход к визуализации злокачественной меланомы – использование в качестве вектора пептидов, аффинных к той или другой структуре опухоли. Злокачественное перерождение меланоцитов связано с продукцией факторов роста и экспрессией рецепторов, которые не вырабатываются нормальными меланоцитами. Этот список включает в себя фактор роста фибробластов, трансформирующие факторы роста альфа и бета, тромбоцитарный фактор роста, интерлейкины, гормон роста, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор роста стволовых клеток и некоторые другие. Любой

из них может служить мишенью, но чаще всего в качестве мишени служат меланкортиновый рецептор 1 типа, меланин и опухоль-ассоциированные интегрины. Большинство работ посвящено использованию α-меланоцитстимулирующего гормона (α-МСГ), связывающегося в наномолярных концентрациях с рецептором MC1R, гиперэкспрессируемым на поверхности клеток подавляющего большинства меланом человека, при этом экспрессия MC1R в клетках меланомы является не только особенностью, связанной с происхождением данного типа опухолей, но напрямую связана с активацией деления клеток и способностью к метастазированию [4, 5].

Цель настоящего исследования – разработка состава радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) для диагностики злокачественной меланомы на основе синтетического аналога α-МСГ (САГ) и радионуклида ^{99m}Tc и экспериментальное изучение *in vitro* эффективности его применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и реактивы

Натрия тартрат (ГОСТ 5845-79), динатрий фосфат (ГОСТ 4172-76), тринатрий фосфат (ГОСТ 201-76), пептид X-Lys¹(Bz-SCH₂CO-Gly-Gly-Gly)-c(Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys⁷-NH₂) (Синтез пептидов, Москва), олово дихлорид ≥99,99 % (Sigma-Aldrich, США), натрия хлорид (х.ч., ГОСТ 4233-77), ацетонитрил для хроматографии, сорт 1, (ГОСТ 3652-69), аргон (ГОСТ 10157-79, высш. сорт), пластины для тонкослойной хроматографии ITLC-SG (Sigma-Aldrich, США).

Оборудование

Генератор технеция-99m ГТ-2М или ГТ-4К (Россия), доз-калибратор АТОМЛАБ-500 (Biodex Medical Systems, Inc., США), сканер радиохроматограмм MiniGita (Elysia-raytest GmbH, Германия), весы аналитические Discovery Ohaus, рН-метр Sartorius PP-20, автоматический гамма-счетчик Wizard 2480-0010 (PerkinElmer LAS/Wallac, США), инкубатор CO₂ MCO-15AC (Sanyo, Япония), бокс микробиологической безопасности БМБ-II-Ламинар-С (ЗАО «Ламинарные системы»).

Для исследований использовался раствор натрия пертехнетата, ^{99m}Tc, получаемый из генераторов согласно инструкции производителя. Раствор радионуклида использовали без дополнительной очистки.

Для операции мечения в пробирки типа Эппендорф, содержащие раствор пептида, добавляли соответствующий буферный раствор, насыщенный аргонном, раствор дихлорида олова и 100–1000 мкл элюата генератора Tc-99m. Пробирки инкубировали с перемешиванием при температуре 25 или 95 °С в течение 15, 30, 60 и 120 мин.

Анализ препарата методом БТСХ проводился на пластинках типа ITLC-SG. На каждую из пластинок длиной 50 мм на расстоянии 10 мм от края наносили аликвоту САГ · ^{99m}Tc и хроматографировали восходящим методом до достижения фронтом растворителя линии на расстоянии 5 мм от другого края. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил/вода 2:1 (об.) или 20 % раствор NaCl в воде. Затем определяли распределение активности с помощью сканера радиохроматограмм или радиометрической установки. В последнем случае полоску разрезали на 2 равные части. Содержание радиоактивных веществ в стартовой части каждой из хроматограммы рассчитывали по формуле:

$$A_{\text{старт}}, \% = \frac{A_{\text{старт}}}{A_{\text{старт}} + A_{\text{фронт}}} \cdot 100,$$

где $A_{\text{старт}}$ – активность стартовой части хроматограммы; $A_{\text{фронт}}$ – активность другой половины хроматограммы.

Полученные результаты относительной активности стартовых частей хроматограмм использовали для расчета радиохимической чистоты препарата по формуле:

$$\text{РХЧ} = A_{\text{NaCl}} - A_{\text{ацет}}$$

где A_{NaCl} – активность стартовой части хроматограммы при использовании в качестве элюента 20 % раствора NaCl в воде, в %; $A_{\text{ацет}}$ – активность стартовой части хроматограммы при использовании в качестве элюента смеси ацетонитрил – вода (2:1), в %; РХЧ – радиохимическая чистота препарата, в %.

Эксперименты *in vitro* проведены на культуре опухлевых клеток-биомшеней, положительных к меланоцитстимулирующему гормону (мышинная меланома В16-F0, α-МСГ+). В качестве сравнительной тест-системы были использованы фибробласты кожи челове-

ка PCS-201-012 (α-МСГ-). Образцы культур клеток получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC) в виде замороженных стоков.

Клетки культивировали в среде следующего состава: среда RPMI-1640 и среда Eagle MEM (из полнокомпонентной смеси фирмы Gibco) в соотношении 3:1 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки – 5 %, L-глутамин – 200 мМ и гентамицин 10 ед/мл в CO₂-инкубаторе при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Для анализа динамики связывания клетками образцов препарата в суспензию $1 \cdot 10^6$ клеток (в триплетах на каждую временную точку) вносили 100 мкл исследуемого раствора с объемной активностью 3,7 МБк/мл. Клетки инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе в течение 15, 30 и 60 минут. Затем радиоактивный раствор удаляли с помощью последовательно трижды повторяемых процедур: осаждения центрифугированием и промывания раствором Хэнкса. Отдельно готовили эталон, представляющий собой 1 мл среды, содержащий 100 мкл САГ · ^{99m}Tc с объемной активностью 3,7 МБк/мл. Радиоактивность каждой пробы и эталона измеряли на автоматическом гамма-счетчике. Уровень общего накопления (связывания) оценивали по формуле:

$$N = \frac{A_i}{A_e} \cdot 100,$$

где A_i – счет пробы клеток, имп/мин; A_e – счет эталона, имп/мин.

Для оценки степени интернализации в 1 мл суспензии, содержащей $1 \cdot 10^6$ клеток, вносили 50 мкл исследуемого САГ · ^{99m}Tc (объемная активность 3,7 МБк/мл). Пробирки с клетками помещали в инкубатор и инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе в течение 15, 30 и 60 минут. Для разделения фракций САГ · ^{99m}Tc, связанных с поверхностными мембранами и цитоплазматическими структурами клеток, использовали глициновый буферный раствор (50 мМ глициновый буферный раствор рН 2,8, 0,1 М NaCl). Интернализацию определяли как отношение поглощенной структурой клеток активности к общей активности, связанной с клетками по формуле:

$$И = \frac{A_k}{A_k + A_m} \cdot 100,$$

где A_m – счет от смыва с мембран, имп/мин; A_k – счет от суспензии клеток, имп/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве векторной молекулы для доставки радионуклида в данной работе был использован пептидный аналог α-меланоцитстимулирующего гормона. α-МСГ представляет собой пептид, состоящий из 13 аминокислот (Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂). Его аминокислотная последовательность одинакова у многих видов

млекопитающих – человека, мыши, крупного рогатого скота и т. д. α -МСГ может связываться с четырьмя типами меланокортиновых рецепторов человека (MCR), кроме MC2R, однако обладает наиболее высоким сродством и наиболее специфичен к MC1R. Для улучшения параметров биокинетики лекарственного средства используется не сам α -МСГ, а его пептидный аналог, содержащий ключевую аминокислотную последовательность (выделена тёмным в формуле выше), отвечающую за связывание с рецепторами MC1R. В качестве объекта исследования использовали синтетический пептид (САГ) X-Lys¹(Bz-SCH₂CO-Gly-Gly-Gly)-c(Asp-His-**DPhe-Arg-Trp**-Lys⁷-NH₂). Выбор такой структуры обусловлен рядом факторов. Для увеличения протеолитической стабильности потенциально радиофармпрепарата в физиологических условиях карбоксильная группа С-концевого лизина была заменена амидной группой. Для введения хелатообразующей группы к N-концевой части пептида был присоединен дополнительный остаток лизина, α -аминогруппа которого свободна или ацилирована для увеличения устойчивости пептида к действию аминопептидаз. Для увеличения устойчивости пептида к действию эндопептидаз введен остаток D-фенилаланина. Кроме того, адресный пептид получен в циклической форме: между β -карбоксильной группой аспарагиновой кислоты и ϵ -аминогруппой С-концевого лизина замкнута амидная связь, поскольку известно, что циклизация – это наиболее эффективный способ получения протеолитически устойчивых пептидов [6, 7]. В качестве хелатообразующей группы для введения радиоизотопа ^{99m}Tc было решено использовать меркаптоацетилтриглицин (MAG₃), который ковалентно связан с ϵ -аминогруппой N-концевого остатка лизина. Эта группа образует устойчивые комплексы с технецием и хорошо подходит для синтеза пептидов как твердофазным, так и классическим методами [8]. Были синтезированы 3 варианта пептида, отличающиеся заместителем у концевой лизина (X = H, OAc или Boc). Свободный амин оказался нестабильным соединением, даже при хранении –18 °С вскоре проявляется изменение окраски образца, что говорит о его деградации. Трет-бутильное производное стабильно при хранении, но очень плохо растворимо в воде. Поэтому дальнейшие работы проводились с ацильным производным, сочетающим хорошие стабильность и растворимость.

Первой стадией работы по мечению пептидного фрагмента была разработка метода анализа радиохимической чистоты (РХЧ, доля радионуклида, находящегося в необходимой химической форме [9]) препарата с достаточной точностью простым и доступным способом. Исходя из этого, был выбран метод планарной хроматографии, как наиболее наглядный и в то же время точный и простой. Было найдено, что для обнаружения возможных компонентов реакционной смеси лучше всего использовать метод быстрой тонкослойной хроматографии (БТСХ, ITLC) на пластинках ITLC-SG. Этот метод нашел широкое применение в последнее время прежде всего для анализа РФЛП на основе пептидов. Мы нашли, что при использовании в

качестве элюента 10 % или 20 % раствора NaCl пертехнетат-ион и комплекс ^{99m}Tc с промежуточным лигандом движутся с фронтом растворителя. При использовании в качестве элюента смеси ацетонитрил – вода в соотношении 2:1 по объему на старте остаются только восстановленные гидролизованные формы технеция (ГВТ), а все остальные меченые соединения движутся с фронтом растворителя. При использовании этих систем хроматографирование проходит быстро и занимает не более 5 минут. Таким образом, по результатам хроматографирования в указанных условиях, РХЧ препарата можно вычислить как разницу активности на стартовой части хроматограммы при использовании в качестве элюента 20 % раствора NaCl в воде (целевой комплекс плюс ГВТ), и активности стартовой части хроматограммы при использовании в качестве элюента смеси ацетонитрил – вода (2:1) (ГВТ).

При изучении возможности мечения САГ в качестве восстановителя использовали дихлорид олова (2+), который обычно входит в состав клинически используемых РФЛП. В качестве реакционной среды для прямого мечения исследовались фосфатный, цитратный, бикарбонатный и боратный буферные растворы в широком диапазоне pH (от 2,4 до 11,8). Буферные растворы выбирались с точки зрения минимального потенциального вреда пациенту. Мечение проводили при 25 и 95 °С, что соответствует обычным для клинических учреждений условиям получения РФЛП на основе Tc-99m при комнатной температуре и в кипящей водяной бане соответственно. Только мечение в фосфатном буфере привело к успеху (РХЧ > 93 %), но при pH реакционной смеси более 11. Такое значение pH не является оптимальным для инъекционного препарата. Увеличение температуры реакционной среды приводит к заметному падению РХЧ, что, скорее всего, связано с деструкцией пептида в таких условиях.

Другой возможный путь мечения пептидов, через промежуточный комплекс ^{99m}Tc, был исследован с использованием тартрата и глюконата натрия. При использовании тартрата успешное (РХЧ > 90 %) мечение можно осуществить в щелочной среде (pH > 10). При этом реакцию при комнатной температуре необходимо проводить не менее 1 ч, а при нагревании (95 °С) достаточно 20–30 мин. При использовании глюконата натрия в качестве дополнительного комплексона при проведении реакции при комнатной температуре во всем исследуемом диапазоне параметров реакции не удается достигнуть величины РХЧ выше 76 %. Однако повышение температуры реакции до 95 °С приводит к заметному росту РХЧ. Оптимальным является проведение реакции в течение 30 мин при pH реакционной смеси около 8.

С целью выбора оптимального состава препарата проведены эксперименты по изучению динамики накопления РФЛП в клетках меланомы B16 *in vitro*. Основным критерием выбора оптимального состава САГ · ^{99m}Tc являлась степень его связывания с клетками меланомы линии B16-F0. Были исследованы 3 образца радиофармпрепаратов следующего состава (на 1 мл) (таблица 1).

Таблица 1. Состав исследуемых образцов САГ · ^{99m}Tc

Table 1. SAH · ^{99m}Tc sample composition

Содержание Substance	№ 1	№ 2	№ 3
Пептид, мг Peptide, mg	0,0385	0,0625	0,0625
SnCl ₂ , мг SnCl ₂ , mg	0,023	0,037	0,040
Промежуточный лиганд Intermediate ligand	Натрия глюконат Sodium gluconate	Натрия тартрат Sodium tartrate	-
Количество лиганда, мг Quality of ligand, mg	7,7	7,7	
Буферный агент, мг Buffering agent, mg	6,5 (Na ₂ HPO ₄)	8,2 (Na ₃ PO ₄)	8,9 (Na ₃ PO ₄)
РХЧ, % Radiochemical purity, %	94,8	98,6	90,2
pH	8,6	9,8	11,2

Результаты *in vitro* экспериментов представлены на рисунке 1.

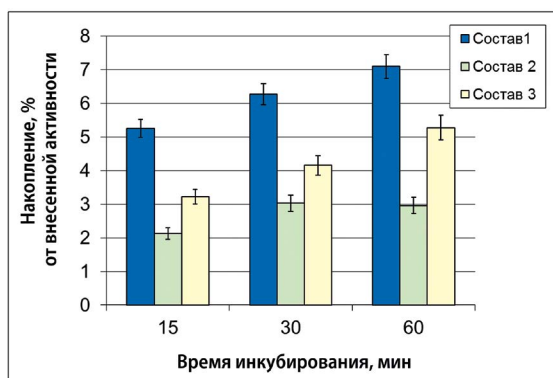


Рисунок 1. Связывание САГ · ^{99m}Tc с клетками меланомы B16-F0

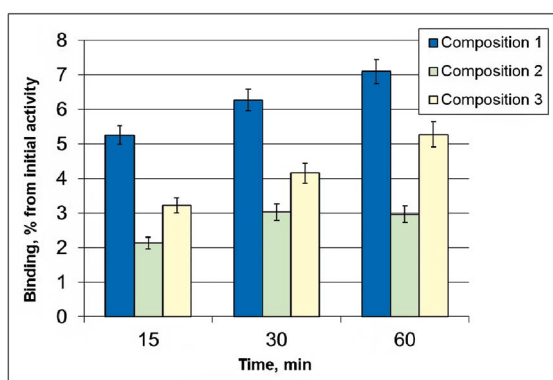


Figure 1. The SAH · ^{99m}Tc binding to B16-F0 melanoma cells

По результатам предварительных экспериментов *in vitro* был сделан выбор в пользу состава САГ · ^{99m}Tc, соответствующего образцу № 1, который был использован в дальнейшем для более тщательного изучения биологического поведения. Было изу-

чено общее накопление и интернализация препарата САГ · ^{99m}Tc положительными и отрицательными культурами клеток, целью которых были подтверждение специфичности исследуемого соединения. Результаты экспериментов по определению представлены в таблице 2.

Таблица 2. Динамика общего накопления и интернализации с использованием тест-системы сравнения

Table 2. The total accumulation and internalization using the test comparison system

	Линия клеток Cells line	
	B16-F0 (α-МСГ+)	PCS-201-012 (α-МСГ-)
Время инкубирования 15 минут Incubation time 15 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	4,12 ± 1,29	0,78 ± 0,15
Интернализация, % Internalization, %	79,7 ± 2,16	69,35 ± 6,2
Время инкубирования 30 минут Incubation time 30 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	5,18 ± 0,44	0,9 ± 0,08
Интернализация, % Internalization, %	85,89 ± 10,43	71,58 ± 5,9
Время инкубирования 60 минут Incubation time 60 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	6,5 ± 0,76	0,88 ± 0,17
Интернализация, % Internalization, %	94,02 ± 3,13	81,94 ± 7,95
Время инкубирования 90 минут Incubation time 90 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	7,17 ± 0,56	1,1 ± 0,08
Интернализация, % Internalization, %	94,72 ± 1,26	67,36 ± 11,68
Время инкубирования 120 минут Incubation time 120 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	7,19 ± 0,63	1,27 ± 0,1
Интернализация, % Internalization, %	95,35 ± 0,52	73,31 ± 16,01

Как показали исследования, препарат интенсивно поглощался опухолевыми клетками. Уровень общего накопления САГ · ^{99m}Tc в культуре клеток пигментированной мышинной меланомы линии B16-F0 составил от 4 до 7 % и был достоверно выше, чем накопление в клетках фибробластов кожи человека PCS-201-012 на всем протяжении эксперимента, что доказывает специфичность диагностического радиофармацевтического препарата на основе синтетического аналога природного α-меланоцитстимулирующего гормона, меченного технецием-99m.

Поскольку клетки меланомы PCS-201-012 не обладают рецепторами к α-МСГ, механизмы накопления и интернализации изучаемого соединения САГ · ^{99m}Tc не специфичны и, вероятнее всего, реализуются путем пассивной диффузии через липиды мембраны. При этом в каждый конкретный момент времени доля САГ · ^{99m}Tc, задержанного в липидном слое мемб-

раны и связанного с внутриклеточными структурами, может колебаться случайным образом. Поэтому при стабильном общем накоплении ($1,1 \pm 0,08$ через 90 минут и $1,27 \pm 0,1$ через 120 минут) интернализированная фракция, т. е. доля САГ · ^{99m}Tc проникшего внутрь клетки, изменяется случайным образом, что еще раз подтверждает рецепторный механизм действия САГ · ^{99m}Tc и неспецифичность накопления исследуемого препарата клетками, не обладающими соответствующими рецепторами.

Для подтверждения рецепторного механизма связывания препарата САГ с биологической мишенью изучали его накопление в присутствии агента, блокирующего целевые рецепторы к α -МСГ. В качестве такого блокирующего агента использовали раствор синтетического аналога природного альфа-меланоцитстимулирующего гормона Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys⁷-NH₂ в дозе 150 мкл на пробу с концентрацией 1 мкМ/мл. Также было проведено исследование накопления раствора сравнения, представляющего собой раствор ^{99m}Tc -пертехнетата натрия.

Результаты изучения динамики накопления радиофармацевтического препарата в присутствии блокирующего агента представлены в таблице 3. Как видно из полученных данных, в присутствии блокирующего раствора накопление САГ · ^{99m}Tc было достоверно в 6,1–7,3 раза ниже, чем в его отсутствие. Эти результаты подтверждают рецепторный механизм связывания САГ · ^{99m}Tc , а практически полное отсутствие накопления раствора сравнения говорит о высокой специфичности САГ · ^{99m}Tc к его биологической мишени.

Таблица 3. Динамика накопления САГ · ^{99m}Tc клетками меланомы В16-F0 (% от внесенной активности)

Table 3. The dynamics of SAH · ^{99m}Tc accumulation by melanoma cells B16-F0 (% of introduced activity)

Условия эксперимента Experiment Conditions	Время инкубирования, мин Incubation time, min		
	30	60	90
САГ · ^{99m}Tc SAH · ^{99m}Tc	$5,15 \pm 0,40$	$6,00 \pm 0,82$	$6,55 \pm 0,90$
САГ · ^{99m}Tc + блокирующий агент SAH · ^{99m}Tc + blocking agent	$0,87 \pm 0,18$	$0,82 \pm 0,13$	$1,03 \pm 0,12$
Раствор сравнения Comparison solution	$0,29 \pm 0,09$	$0,43 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,04$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Найден оптимальный состав, позволяющий получить радиофармацевтический лекарственный препарат на основе синтетического аналога α -МСГ (САГ) и радионуклида Тс-99m с выходом более 90 %.
2. Общее накопление исследуемого РФЛП в клетках меланомы линии В16-F0 происходит по рецепторному механизму.
3. Исследуемый препарат быстро и в значительной степени проникает во внутренние структуры клеток меланомы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Статистический сборник 2018 год от 31 июля 2019 г. Министерство здравоохранения РФ. Доступно по: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2018-god>. Ссылка активна на 29.06.2020.
2. Cancer Statistics Review (CSR) 1975–2017. National Cancer Institute. Released April 15, 2020. Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/ Accessed: 25.05.2020.
3. Российский онкологический портал. Доступно по: <https://www.oncoforum.ru/o-rake/statistika-raka/statistika-smertnosti-ot-raka-v-rossii.html>. Ссылка активна на 15.06.2020.
4. Розенкранц А. А., Слостникова Т. А., Дуриманов М. О., Соболев А. С. Меланокортиновые рецепторы первого типа и меланома. *Биохимия*. 2013;78(11):1564–1575.
5. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *British Journal of Cancer*. 2002;87(4):414–422. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600441.
6. Zhang C., Lin K.-Sh., Benard F. Molecular Imaging and Radionuclide Therapy of Melanoma Targeting the Melanocortin 1 Receptor. *Molecular Imaging*. 2017;16:1–15. DOI: 10.1177/1536012117737919.
7. Eberle A. N., Bhimsen R., Qi M. B., Bigliardi P. L. Synthetic Peptide Drugs for Targeting Skin Cancer: Malignant Melanoma and Melanotic Lesions. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(17):1797–1826. DOI: 10.2174/0929867324666170605105942.
8. Banerjee S. R., Maresca K. P., Francesconi L., Valliant J., Babich J. W., Zubieta J. New Directions in the Coordination Chemistry of ^{99m}Tc : A Reflection on Technetium Core Structures and a Strategy for New Chelate Design. *Nucl Med Biol*. 2005;32(1):1–20. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2004.09.001.
9. ОФС.1.11.0001.15. Радиофармацевтические лекарственные препараты. Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-11-0001-15-radiofarmatsevticheskie-lekarstvennye-preparaty/> Ссылка активна на 25.06.2020.

REFERENCES

1. Annual Statistic Report 2018 of July 31, 2019. Ministry of Health of the Russian Federation. Available at: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2018-god>. Accessed: 29.06.2020. (In Russ.).
2. Cancer Statistics Review (CSR) 1975–2017. National Cancer Institute. Released April 15, 2020. Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/ Accessed: 25.05.2020.
3. Russian Cancer Portal. Available at: <https://www.oncoforum.ru/o-rake/statistika-raka/statistika-smertnosti-ot-raka-v-rossii.html> Accessed: 15.06.2020. (In Russ.).
4. Rosenkranz A. A., Slastnikova T. A., Durymanov M. O., Sobolev A. S. Malignant melanoma and melanocortin receptor 1. *Biokhimiya = Biochemistry*. 2013;78(11):1564–1575. (In Russ.).
5. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *British Journal of Cancer*. 2002;87(4):414–422. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600441.
6. Zhang C., Lin K.-Sh., Benard F. Molecular Imaging and Radionuclide Therapy of Melanoma Targeting the Melanocortin 1 Receptor. *Molecular Imaging*. 2017;16:1–15. DOI: 10.1177/1536012117737919.
7. Eberle A. N., Bhimsen R., Qi M. B., Bigliardi P. L. Synthetic Peptide Drugs for Targeting Skin Cancer: Malignant Melanoma and Melanotic Lesions. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(17):1797–1826. DOI: 10.2174/0929867324666170605105942.
8. Banerjee S. R., Maresca K. P., Francesconi L., Valliant J., Babich J. W., Zubieta J. New Directions in the Coordination Chemistry of ^{99m}Tc : A Reflection on Technetium Core Structures and a Strategy for New Chelate Design. *Nucl Med Biol*. 2005;32(1):1–20. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2004.09.001.
9. Russia pharmacopoeia monograph 1.11.0001.15. Radiopharmaceutical drugs. Available at: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-11-0001-15-radiofarmatsevticheskie-lekarstvennye-preparaty/> Accessed: 25.06.2020. (In Russ.).