

Сведения о ходе выполнения проекта по Соглашению № 14.607.21.0041 от 22.07.2014г.

(Руководитель проекта, доктор ф.-м. наук Д.Ю. Чувилин)

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии №14.607.21.0041 от 22.07.2014 г. Минобрнауки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы» на этапе № 2 «Разработка радиоиммунного препарата с бета-излучающим радионуклидом лютеций-177 для терапии злокачественных новообразований, гиперэкспрессирующих на поверхности клетки онкомаркер HER2/neu» в период с 01.01.2015 г. по 30.06.2015 г. выполнялись следующие работы:

1. Проведена наработка экспериментальных образцов РФП и анализ их качества.
2. Проведено исследование цитотоксичности РФП для опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu (исследования *in vitro*).
3. Разработана методика подтверждения стабильности РФП в физиологических средах.
4. Проведено исследование стабильности РФП в физиологическом растворе (исследования *in vitro*).
5. Проведено исследование стабильности РФП в сыворотке крови (исследования *in vitro*).
6. Подведены итоги этапа и разработана отчетная документация.

В результате выполнения второго этапа работ по Соглашению № 14.607.21.0041 о предоставлении субсидии получены нижеследующие основные результаты:

Сделан обзор современной научно-технической, нормативной и методической литературы, обоснован выбор направлений исследования, как в части создания РФП, так и в части изучения его функциональной пригодности. Количество использованных источников в литературном обзоре - 94, из них 25 публикации с 2009 г. по настоящее время.

Проведенные патентные исследования подтвердили патентную чистоту методов и подходов, используемых в настоящих прикладных научных исследованиях. Анализ выявленных патентов показал, что разработка отвечает основным тенденциям развития данного направления, на дату окончания патентных исследований не выявлено решений, совпадающих с предлагаемыми разработчиками. Результаты проведенных патентных исследований позволяют на следующих этапах проведения работ выявить объекты возможной правовой охраны.

Разработан технологический процесс получения РФП с β -излучающим радионуклидом ^{177}Lu . С целью повышения качества получения РФП проведена модернизация автоматизированного модуля синтеза. Модернизация коснулась, как технологического процесса, так и архитектуры АСУ. Для сокращения времени синтеза РФП и улучшения его качества транспортировка рабочих растворов в экспериментальном образце автоматизированного модуля синтеза осуществляется перистальтиче-

ским насосом взамен шприцевого, а дозировка - посредством съёмной кассеты с дозированным количеством растворов.

Разработан Лабораторный технологический регламент получения РФП и изготовлены экспериментальные образцы РФП в количестве десяти штук и исследованы их свойства на соответствие ТЗ. Разработан план доклинических исследований РФП.

Разработана методика определения селективности накопления и связывания РФП с опухолевыми клетками, гиперэкспрессирующими онкомаркер HER2/neu, основанная на проведении *in vitro* процедур иммуноцитохимического окрашивания, иммуноферментного анализа и калориметрического МТТ-теста. По данным иммуноцитохимического окрашивания производилась визуальная оценка экспрессии рецептора HER2/neu на поверхности раковых клеток. Методом иммуноферментного анализа, подобрав оптимальные условия иммунохимической реакции, с помощью спектрофотометра фиксировалось изменение интенсивности хромогенной реакции с коммерческими анти-HER2/neu антителами после предварительной инкубации опухолевых клеток с образцами РФП в различных концентрациях. По данным МТТ-теста оценивалось количество жизнеспособных клеток в опытной группе клеток, инкубированных с РФП, относительно контрольной группы.

Исследована специфичность связывания РФП с опухолевыми клетками, несущими онкомаркер HER2/neu в сравнении с контрольными клетками. При проведении иммуноферментного анализа в ингибиторном варианте в опытной группе HER2/neu+ клеток, инкубированных с РФП, было зафиксировано падение интенсивности окрашивания по сравнению с группой контрольных клеток. Было показано, что РФП обладает способностью ингибировать связывание коммерческих анти-HER2/neu антител с рецептором HER2/neu, что обусловлено специфической активностью рекомбинантных мини-антител в составе конструкции молекул РФП к онкомаркеру HER2/neu, обеспечивая связывание РФП с опухолевыми клетками.

Исследовано накопление РФП на опухолевых клетках в зависимости от его концентрации в инкубационной среде. Накопление препарата исследовалось с помощью калориметрического МТТ-теста. Наблюдалось выраженное ингибирующее влияние образцов РФП на рост HER2/neu+ опухолевых клеток. Было показано, что с увеличением концентрации РФП в инкубационной среде усиливается блокирующее влияние радиопрепарата на рост раковых клеток.

Наработаны экспериментальные образцы РФП с β -излучающим радионуклидом ^{177}Lu . Нарработку ^{177}Lu проводили в исследовательском ядерном реакторе ИР-8.

Всего на этапе 2 было наработано 13 образцов РФП состава «человеческий сывороточный альбумин – мини-антитело – хелатор – радионуклид ^{177}Lu ».

Проведено радиохимическое выделение ^{177}Lu из облученных мишеней и анализ его качества. Очистка от иттербия осуществлена на установке с последовательными ступенями электролиза на

ртутном катоде и цементации амальгамой натрия. Проведены четыре ступени, повторяя электролиз и цементацию два раза.

Радиоиммуноконъюгат состава «ЧСА – мини-антитело – хелатор - радионуклид ^{177}Lu » получен на автоматизированном модуле синтеза.

Проведена оценка цитостатического эффекта коммерческого противоопухолевого HER2/neu-ассоциированного препарата Герцептин® Трастузумаб, рассматриваемого в качестве образца для контроля специфичности связывания мини-антител, входящих в состав РФП, как на клетках с гиперэкспрессией онкомаркера (BT-474), так и на клетках с низкой экспрессией (MCF-7).

Исследована цитотоксичность РФП с радионуклидом ^{177}Lu на опухолевых клетках РМЖ BT-474, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu (исследования *in vitro*).

По результатам колориметрического МТТ-теста при суточной инкубации клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu, показано, что образцы РФП в области терапевтических доз оказывают интенсивное, близкое к 100%, токсическое воздействие.

Разработана методика подтверждения стабильности РФП в физиологических средах – в физиологическом растворе и сыворотке крови человека.

Исследована стабильность РФП в растворе сыворотки крови человека (плазма крови, лишенная фибриногена), полученной из лиофилизата путем разведения в деионизованной воде. Эксперименты показали, что РФП стабилен в растворе сыворотки крови человека - РХЧ препарата находится в пределах 91 – 97 %.

Таким образом, данный препарат можно использовать для проведения доклинических *in vitro* и *in vivo* исследований.

В рамках внебюджетного финансирования для обеспечения выполнения работ на этапе 2 был выполнен комплекс регламентных, профилактических, пуско-наладочных мероприятий; методических и метрологических работ на электромагнитном сепараторе С-2, лаборатории химического анализа, реакторе ИР-8 и защитных камерах.

Подана заявка № 2015115120 от 22.04.2015 г. на изобретение «Способ получения радионуклида лютеций-177», РФ.

Область применения - ядерная медицина, радиоиммунотерапия, терапия метастазов, биохимия.

Таким образом, все задачи второго этапа работ выполнены в соответствии с планом-графиком исполнения обязательств и техническим заданием Соглашения № 14.607.21.0041 о предоставлении субсидии от 22 июля 2014 г.