

## Возможности радионуклидной визуализации HER2/neu-позитивного рака молочной железы с использованием радиофармпрепарата на основе рекомбинантных адресных молекул DARPin9\_29

О.Д. Брагина<sup>1,2</sup>, В.И. Чернов<sup>1,2</sup>, А.А. Медведева<sup>1</sup>, Р.В. Зельчан<sup>1,2</sup>,  
М.С. Ларькина<sup>2,3</sup>, С.М. Деев<sup>2,4</sup>, В.М. Толмачев<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский институт онкологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН  
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5*

<sup>2</sup> *Национальный исследовательский Томский политехнический университет  
634050, г. Томск, просп. Ленина, 30*

<sup>3</sup> *Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
634050, г. Томск, Московский тракт, 2*

<sup>4</sup> *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

<sup>5</sup> *Уппсальский университет  
Швеция, Уппсала, Segerstedthuset, Dag Hammarskjölds väg, 7*

### Резюме

До сих пор большой интерес представляет изучение рецептора эпидермального роста HER2/neu, гиперэкспрессия которого наиболее часто отмечается у больных раком молочной железы (РМЖ) (в 15–20 % случаев). Существующие методики для определения данного маркера имеют ряд существенных недостатков. В последние годы актуальным для проведения таргетной (направленной) радионуклидной визуализации является применение альтернативных каркасных белков, к одному из которых относится молекула DARPin (Design Ankyrin Repeat Protein). **Материал и методы.** В исследование были включены 4 пациентки с диагнозом РМЖ ( $T_{1-2}N_{0-1}M_0$ ), не получавшие на момент исследования системную терапию: у двух больных отмечалась гиперэкспрессия HER2/neu, у двух экспрессии выявлено не было. Статус HER2/neu определялся с применением иммуногистохимического метода исследования и FISH-анализа. Всем больным на этапе диагностики проводились внутривенное введение препарата  $^{99m}\text{Tc}$ -DARPin9\_29 с проведением сцинтиграфии в режиме «WholeBody» и однофотонная эмиссионная компьютерная томография через 2 ч после введения. **Результаты.** При анализе распределения радиофармацевтического препарата в органах через 2 ч после введения наибольшее накопление вещества определялось в печени и почках. Изучение показателя «опухоль/фон» в обеих группах больных показало, что его значения у больных с позитивным статусом рецептора HER2 более чем в 3 раза превосходят соответствующие величины в подгруппе больных с отрицательной экспрессией маркера. **Заключение.** По результатам предварительных исследований радиофармацевтический препарат  $^{99m}\text{Tc}$ -DARPin9\_29 продемонстрировал существенные различия между больными с гиперэкспрессией и без экспрессии рецептора HER2/neu в опухолевой ткани.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, DARPin9\_29, таргетная радионуклидная диагностика.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Брагина О.Д., e-mail: rungis@mail.ru

**Для цитирования:** Брагина О.Д., Чернов В.И., Медведева А.А., Зельчан Р.В., Ларькина М.С., Деев С.М., Толмачев В.М. Возможности радионуклидной визуализации HER2/neu-позитивного рака молочной железы с использованием радиофармпрепарата на основе рекомбинантных адресных молекул DARPin9\_29. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (4): 35–43. doi: 10.15372/SSMJ20200405

# Possibilities of radionuclide visualization of HER2/neu-positive breast cancer using a radiopharmaceutical based on recombinant targeting molecules DARPin9\_29

O.D. Bragina<sup>1,2</sup>, V.I. Chernov<sup>1,2</sup>, A.A. Medvedeva<sup>1</sup>, R.V. Zelchan<sup>1,2</sup>,  
M.S. Larkina<sup>2,3</sup>, S.M. Deyev<sup>2,4</sup>, V.M. Tolmachev<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of RAS  
634009, Tomsk, Kooperativny ln., 5

<sup>2</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, Russian Federation  
634050, Tomsk, Lenina av., 30

<sup>3</sup> Siberian State Medical University of Minzdrav of Russia,  
634050, Tomsk, Moskovsky path, 2

<sup>4</sup> Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS  
117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10

<sup>5</sup> Uppsala University  
Sweden, Uppsala, Segerstedthuset, Dag Hammarskjölds väg, 7

## Abstract

Epidermal growth receptor HER2/neu is still of great interest, the overexpression of which is most often observed in patients with breast cancer and accounts for 15–20 % of cases. Present methods of HER2/neu determination have a number of significant drawbacks. In recent years, alternative framework proteins are used for the targeted radionuclide imaging. Molecules of DARPin (Design Ankyrin Repeat Protein) are one of representatives of scaffolds. Material and methods. The study included 4 breast cancer patients ( $T_{1-2}N_{0-1}M_0$ ) who were not receiving systemic therapy at the time of the study: in 2 patients, HER2/neu overexpression was noted, in 2 patients – not detected. HER2/neu status was determined using an immunohistochemical method and a FISH assay. At the preclinical stage, radiopharmaceutical <sup>99m</sup>Tc-DARPin9\_29 was injected intravenously to all patients, «WholeBody» scintigraphy and single-photon emission computed tomography were performed 2 hours after injection. Results. The distribution of radiopharmaceuticals in organs 2 hours after injection revealed the greatest accumulation in the liver and kidneys. In studying of tumor/background indicator it was revealed that values of the studied parameter in patients with overexpression of HER2 receptors are more than 3 times higher than the values in the subgroup of patients with negative expression of this marker. Conclusion. According to the results of preliminary studies, the <sup>99m</sup>Tc-DARPin9\_29 demonstrated significant differences between tumors with and without HER2/neu overexpression.

**Key words:** breast cancer, DARPin9\_29, target radionuclide diagnostic.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Bragina O.D., e-mail: rungis@mail.ru

**Citation:** Bragina O.D., Chernov V.I., Medvedeva A.A., Zelchan R.V., Larkina M.S., Deyev S.M., Tolmachev V.M. Possibilities of radionuclide visualization of HER2/neu-positive breast cancer using a radiopharmaceutical based on recombinant targeting molecules DARPin9\_29. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40 (4): 35–43. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200405

## Введение

В настоящее время, несмотря на расширение спектра изучаемых молекулярных маркеров в онкологической практике, большой интерес по-прежнему прикован к рецептору эпидермального фактора роста HER2/neu, гиперэкспрессия которого определяется на поверхности опухолевых

клеток многих злокачественных образований, таких как рак желудка, яичников, простаты и пр. [1]. Однако наиболее часто повышенная экспрессия HER2/neu наблюдается у больных раком молочной железы (РМЖ) (в 15–20 % случаев). Данный тип опухоли ассоциируется с агрессивным течением заболевания, а также с неблагоприятным прогнозом относительно безрецидивной и

общей выживаемости [2]. Несомненно, важным остается тот факт, что гиперэкспрессия HER2/неу является показанием для назначения направленной терапии с использованием различных таргетных препаратов (трастузумаб, пертузумаб, трастузумаб эмтанзин), применение которых существенно изменяет прогноз при данной опухолевой патологии [3].

Наибольшее распространение для определения статуса HER2/неу получили иммуногистохимический метод исследования, а также флуоресцентная и хромогенная гибридизация *in situ* (FISH и CISH). Однако данные методики имеют ряд недостатков, к которым относятся невозможность выполнения исследования *in vivo* с определением распространенности опухолевого процесса: оценка основного опухолевого узла, регионарных лимфатических узлов и отдаленных органов и тканей) [4]; оценка случаев, связанных с гетерогенностью экспрессии рецептора HER2/неу в опухолевой ткани; необходимость выполнения инвазивных процедур (биопсия и/или хирургическое вмешательство), а также достаточно большая частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов [5].

В настоящее время для диагностики злокачественных заболеваний все большее распространение получает таргетная (направленная) радионуклидная визуализация, главными преимуществами которой являются высокая специфичность к различным молекулярным мишеням и возможность определения как основного опухолевого узла, так и метастатических очагов [6–8]. На данном этапе развития молекулярных и генетических технологий для этих целей используются структуры, получившие название «альтернативных каркасных белков» [9, 10]. Основные преимущества таких молекулярных конструкций обусловлены их связыванием исключительно с таргетным антигеном для специфической локализации, отсутствием иммуногенности, стабильностью и возможностью быстрой химической модификации для проведения процессов меченя [11]. Существенным для медицинской визуализации являются также скорость связывания с мишенью и быстрое удаление несвязавшихся молекул из организма пациента для достижения высокого качества визуализации опухоли и сокращения временного промежутка между инъекцией и началом исследования [12].

Одним из представителей альтернативных каркасных белков является таргетная молекула DARPIn (Design Ankyrin Repeat Protein) [13–17], к главным особенностям которой относят небольшой размер (14–20 кДа) [18–20], стабильную структуру, высокую специфичность и аффин-

ность к антигену, а также значительно более низкую стоимость производства, обусловленную их экспрессией в бактериальных средах [20–23].

В рамках проекта «Доклинические исследования радиофармацевтического препарата (РФП) на основе меченных <sup>99m</sup>Tc рекомбинантных адресных молекул для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией HER-2/неу» (ГК № 14.N08.11.0163) Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу» был разработан новый РФП на основе меченных технецием-99m рекомбинантных адресных молекул DARPIn<sub>9\_29</sub> для радионуклидной диагностики злокачественных новообразований с гиперэкспрессией HER2/неу и выполнен полный комплекс его доклинических исследований [24–26].

Целью настоящего исследования является изучение возможности применения РФП <sup>99m</sup>Tc-DARPIn<sub>9\_29</sub> для выявления HER2-позитивного РМЖ у человека.

## Материал и методы

В исследование было включено 4 больных РМЖ (Т1-2N0-1M0), находившихся на лечении в НИИ онкологии Томского НИМЦ в 2019–2020 гг. и не получавших на момент исследования какой-либо системной терапии. У двух женщин отмечалась гиперэкспрессия HER2/неу, у двух маркер не выявлен. Средний возраст пациенток составил  $51,3 \pm 4,6$  года. Исследование одобрено биоэтическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 7 от 24.04.2017 г.). Критерии включения пациенток в исследование: впервые диагностированный, морфологически верифицированный РМЖ с экспрессией ( $n = 15$ ) и без экспрессии ( $n = 15$ ) HER2/неу стадии Т1-4N0-3M0-1; общее состояние с оценкой по системе ECOC-ВОЗ 0–2 балла; подписанное информированное согласие на участие в научном исследовании. Критерии исключения: выраженная анемия, лейкопения, тромбоцитопения, сепсис, кахексия, тяжелая сопутствующая патология; клаустрофобия; отказ от лечения.

Все больные находились под динамическим наблюдением в течение 48 часов после введения РФП с оценкой жалоб пациентов, частоты сердечных сокращений (ЧСС), артериального давления (АД) и температуры тела до введения препарата, через 2, 4, 6, 24 и 48 ч после инъекции. Также у всех больных по стандартным методикам в условиях лаборатории НИИ онкологии Томского НИМЦ выполнялись общий и биохимический

анализы крови и общий анализ мочи до введения исследуемого соединения, через 48 ч и 7 дней.

#### **Морфологические методы исследования.**

На диагностическом этапе всем больным проводилось морфологическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного материала первичного опухолевого узла по стандартным методикам. Диагноз РМЖ устанавливался согласно «Гистологической классификации опухолей молочной железы» (ВОЗ, 2019). Иммуногистохимическое исследование биопсийного материала выполнялось с использованием антител фирмы Dako (США) к онкопротеину c-erbB-2 (рабочее разведение 1:500, кроличьи). При оценке результатов негативными считались случаи с отсутствием окрашивания или со слабым, прерывистым мембранным окрашиванием (категории 0 и 1+), положительными – случаи с сильным окрашиванием всей цитоплазматической мембраны более 10 % опухолевых клеток (категории 3+). При наличии от слабого до умеренного окрашивания всей цитоплазматической мембраны более 10 % опухолевых клеток (категории 2+) всем пациенткам выполнялся FISH-анализ по стандартной методике с использованием ДНК-зонда ERBB2(17q12)/SE17 (Kreatech, США). Результат реакции оценивался с помощью люминесцентного микроскопа Axiostar PLUS (Carl Zeiss, Германия). Положительными считались результаты теста при соотношении среднего количества копий гена *HER2/neu* и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке более 2,2.

#### **Радионуклидные методы исследования.**

Препарат готовился непосредственно перед введением с использованием трикарбонильной методики, для чего в асептических условиях в набор «CRS Isolink» – Center for Radiopharmaceutical Science, Paul Scherrer Institute, Villigen, Швейцария (в состав набора входят 2,9 мг натрия тетрабората декагидрата, 7,8 мг натрия карбоната, 4,5 мг динатрия боранокарбоната и 9,0 мг калия натрия тартрата тетрагидрата) добавлялось 500 мкл (4 ГБк) элюата  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  и после инкубирования в течение 30 мин при температуре 100° С [2, 25] 1 мл трикарбонильного технеция добавлялся к 1200 мкг DARPin9\_29, смесь инкубировалась при температуре 40 °С в течение 60 мин (лабораторный регламент получения РФП ЛР-02069303-0217 от 03.02.2017 г.). Очистка полученного соединения от белковых примесей и не связавшихся с технецием молекул DARPin9\_29 проводилась с использованием очистительных колонок NAP-5 (GE Healthcare, Швеция) [24]. Полученный после очищения препарат разбавлялся в 10 мл 0,9%-го раствора NaCl, забирался через стерилизующий фильтр и после измерения активности медленно вводился пациенту внутривенно.

Синтез и очистка РФП осуществлялись в условиях отделения радионуклидной диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ.

#### **Сцинтиграфия в режиме «WholeBody».**

Сцинтиграфические исследования выполнялись на гамма-камере E.CAM 180 (Siemens, Германия) в режиме «WholeBody» с использованием параллельных высокопрозрачных коллиматоров для энергии 140 КэВ в положении «лежа на спине» через 2 ч после введения со скоростью сканирования 15 см/мин. Срок 2 ч был выбран для начального этапа данного исследования, основываясь на результатах по изучению распределения ADAPT6, ближайшего аналога  $^{99m}\text{Tc}$ -DARPin9\_29, выполненных в условиях отделения радионуклидной диагностики НИИ онкологии [неопубликованные данные].

#### **Однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ)**

выполнялась пациентам в положении «лежа на спине» через 2 ч после введения препарата, в поле зрения при котором входили голова, шея, аксиллярная область и грудная клетка до уровня бифуркации трахеи. Проводилась запись 32 проекций (каждая проекция по 30 с) в матрицу 64 × 64 пикселя без аппаратного увеличения.

#### **Обработка данных и используемые показатели.**

При выполнении исследований полученные данные подвергались постпроцессинговой обработке с использованием специализированного пакета программ E.Soft (Siemens, Германия), при этом изучался уровень аккумуляции препарата в основных органах и тканях путем обведения «зоны интереса» (ROI) на изображениях «Wholebody» в передней и задней проекциях. Биораспределение РФП было представлено в виде процента аккумуляции РФП в «зонах интереса» от показателя общего счета в обеих проекциях. Также оценивался характер накопления РФП в исследуемой области: симметричность, интенсивность, однородность накопления РФП; наличие и численность очаговых включений индикатора в исследуемом органе, регионарных лимфоузлах (патологическим считались асимметричные участки гиперфиксации РФП); наличие других очагов патологического включения РФП в пределах исследуемой области. Кроме этого в исследуемых группах рассчитывался количественный показатель «опухоль/фон», отражающий степень аккумуляции препарата в патологическом очаге по сравнению с интактными тканями. Указанный показатель оценивался путем обведения «зоны интереса» (ROI) опухоли на аксиальных срезах с наилучшей визуализацией последней; в качестве «фона» использовались симметричные «зоны интереса» контрлатеральной молочной железы.



## Результаты и их обсуждение

Активность препарата непосредственно перед введением больным составила  $434 \pm 19,5$  МБк. Во время проведения исследования жалоб, изменений ЧСС, АД и температуры, а также изменений в показателях крови и мочи не выявлено. При изучении распределения РФП в органах через 2 ч после введения существенных различий между пациентками с положительным и отрицательным статусом HER2/неу не выявлено: наибольшее накопление вещества в обеих группах отмечалось в печени и почках (26,28 и 6,68 % от введенной дозы соответственно). Полученные результаты представлены в табл. 1 и на рис. 1. Величина показателя «опухоль/фон» у больных с позитивным статусом рецептора HER2 более чем в 3 раза превосходит значения пациентов с отрицательной экспрессией данного маркера (табл. 2).

В качестве клинических примеров нами представлены данные обследования больных РМЖ: в одном случае выявлена гиперэкспрессия рецептора HER2/неу в опухолевой ткани (рис. 2), в другом – не обнаружена (рис. 3). При анализе данных, полученных при использовании препарата

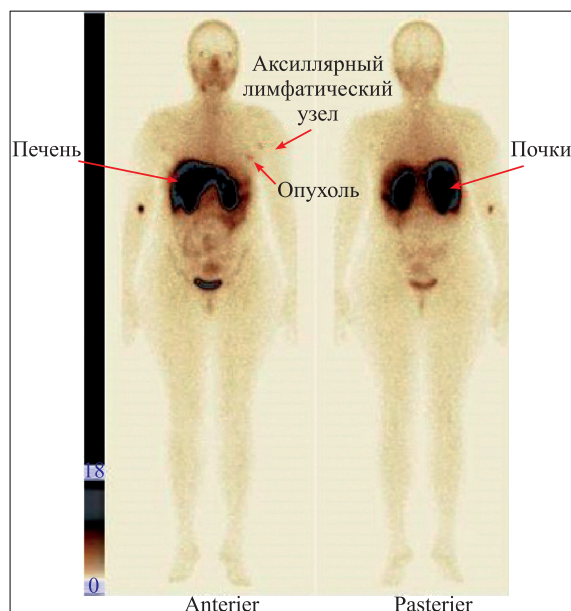


Рис. 1. Биораспределение препарата  $^{99m}\text{Tc-DARPin9}_29$  в органах и тканях (в передней и задней проекциях) через 2 ч после введения у больной РМЖ

Fig. 1. Biodistribution of  $^{99m}\text{Tc-DARPin9}_29$  in organs and tissues (in anterior and posterior projections) 2 hours after injection in breast cancer patient

Таблица 1. Распределение препарата  $^{99m}\text{Tc-DARPin9}_29$  в органах и тканях (в передней и задней проекциях) через 2 ч после введения у больных РМЖ

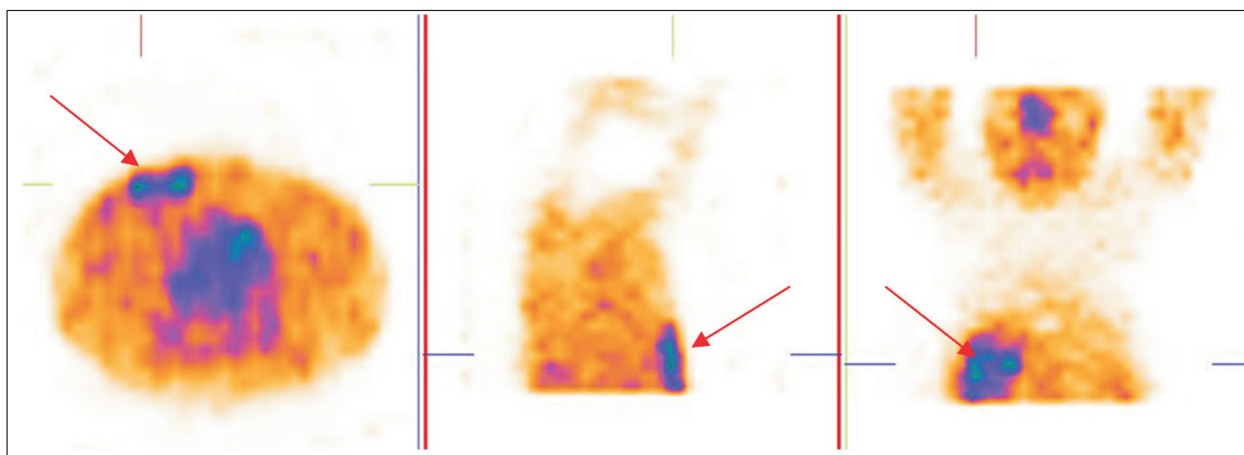
Table 1. Biodistribution of  $^{99m}\text{Tc-DARPin9}_29$  in organs and tissues (in anterior and posterior projections) 2 hours after injection in breast cancer patients

Референсный орган	Суммарное количество импульсов в двух проекциях	Доля от показателя общего счета, %
Надпочечники	$4391 \pm 247,4$	$0,28 \pm 0,06$
Головной мозг	$12\ 706 \pm 103,3$	$0,81 \pm 0,09$
Молочная железа	$625\ 68 \pm 1221,1$	$3,98 \pm 1,27$
Желчный пузырь	$9390 \pm 422,5$	$0,59 \pm 0,05$
Нижняя стенка толстой кишки	$12\ 737 \pm 437,2$	$0,81 \pm 0,07$
Тонкая кишка	$18\ 271 \pm 532,7$	$1,12 \pm 0,6$
Желудок	$13\ 159 \pm 316,3$	$0,84 \pm 0,04$
Верхняя стенка толстой кишки	$23\ 574 \pm 846,8$	$1,49 \pm 0,61$
Сердце	$7461 \pm 623,4$	$0,47 \pm 0,09$
Почки	$255\ 938 \pm 9134,2$	$26,28 \pm 7,41$
Печень	$196\ 518 \pm 1041,9$	$6,68 \pm 2,31$
Легкие	$90\ 009 \pm 2150,9$	$5,72 \pm 1,53$
Яичники	$1385 \pm 211,1$	$0,09 \pm 0,007$
Поджелудочная железа	$7439 \pm 327,3$	$0,47 \pm 0,06$
Кожа	$167\ 188 \pm 2235,7$	$10,62 \pm 3,65$
Селезенка	$4297 \pm 226,7$	$0,27 \pm 0,05$
Тимус	$2422 \pm 121,6$	$0,15 \pm 0,009$
Щитовидная железа	$2407 \pm 114,5$	$0,15 \pm 0,006$
Мочевой пузырь	$21248 \pm 641,4$	$1,35 \pm 0,86$
Матка	$1309 \pm 98,7$	$0,08 \pm 0,0008$
Мышцы	$26\ 786 \pm 2163,1$	$1,06 \pm 0,12$
Все тело	$1\ 573\ 572 \pm 34721,4$	

**Таблица 2.** Соотношение «опухоль/фон» основного опухолевого узла у больных РМЖ через 2 ч после введения препарата  $^{99m}\text{Tc-DARPin9\_29}$

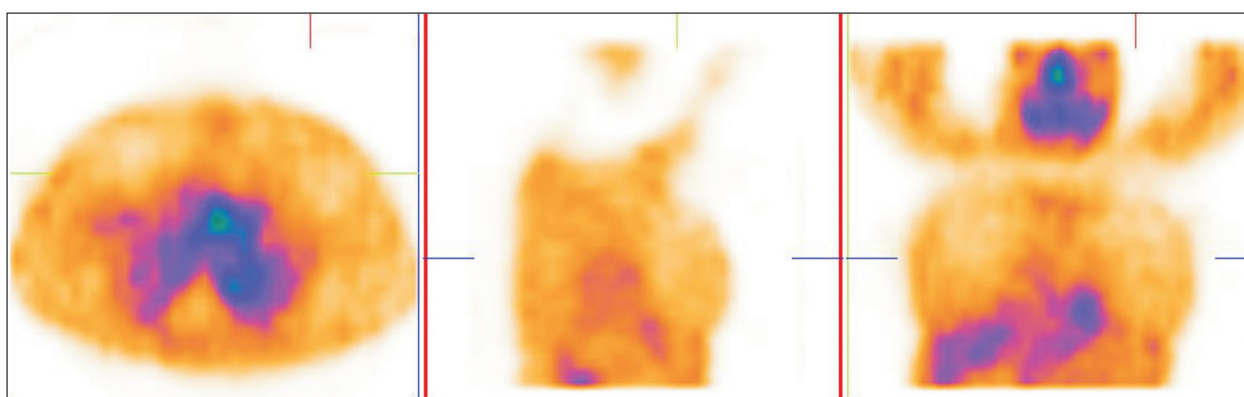
**Table 2.** Tumor/background indicator of tumor in breast cancer patients 2 hours after injection of  $^{99m}\text{Tc-DARPin9\_29}$

Статус HER2/neu	Суммарное количество импульсов в опухоли	Суммарное количество импульсов в фоновом участке	Показатель «опухоль/фон»
Позитивный	5541	560	9,8
	4985	521	9,5
Негативный	1831	502	3,6
	1643	431	3,8



**Рис. 2.** Данные ОФЭКТ пациентки с позитивным статусом HER2/neu через 2 ч после введения препарата  $^{99m}\text{Tc-DARPin9\_29}$ : высокая интенсивность накопления индикатора в центральных отделах левой молочной железы (стрелки указывают на опухоль в левой молочной железе)

**Fig. 2.** SPECT in HER2-positive breast cancer patient 2 hours after injection of  $^{99m}\text{Tc-DARPin9\_29}$ : visualization of high radiopharmaceutical accumulation in central part of left breast cancer (arrows indicate tumor in left breast cancer)



**Рис. 3.** Данные ОФЭКТ пациентки с отрицательным статусом HER2/neu через 2 ч после введения препарата  $^{99m}\text{Tc-DARPin9\_29}$ : отсутствие накопления препарата в проекции опухоли в верхненаружном квадранте левой молочной железы

**Fig. 3.** SPECT in HER2-negative breast cancer patient 2 hours after injection of  $^{99m}\text{Tc-DARPin9\_29}$ : radiopharmaceutical do not accumulates in tumor projection in upper outer quadrant of left breast cancer

$^{99m}\text{Tc}$ -DARPin9\_29, у первой больной отмечалось высокое накопление соединения в проекции опухоли в центральном отделе левой молочной железы, что соответствовало данным других обследований; во втором случае опухоль практически не визуализировалась.

## Обсуждение

По результатам предварительных исследований РФП  $^{99m}\text{Tc}$ -DARPin9\_29 продемонстрировал существенные различия между больными как с экспрессией рецептора HER2 в опухолевой ткани, так и без нее. Не оставляет сомнений факт необходимости дальнейшего набора пациентов, продолжения анализа в отношении распределения изучаемого препарата в органах и тканях и накопления в опухолевых очагах на различных временных точках, а также включения в анализ дополнительных параметров, например «опухоль/печень», для изучения возможности диагностики метастатического поражения печени у данной категории пациенток.

На сегодняшний день в мировой литературе имеются лишь единичные исследования по визуализации злокачественных опухолей с гиперэкспрессией HER2/неу с помощью каркасных белков. В частности, завершены I и II фазы клинических исследований для меченого аффибоди, которые показали хорошую переносимость и отсутствие высокой лучевой нагрузки у пациентов. Также применение данных препаратов возможно для детекции метастазов, экспрессирующих белок, и для дифференциации метастазов с высокой и низкой экспрессией целевых рецепторов. В то же время авторам не удалось получить РФП на основе наиболее распространенного и доступного в мировой ядерной медицине  $^{99m}\text{Tc}$  для использования в рутинной клинической практике [27].

Таким образом, при дальнейших положительных результатах исследования, возможно, в будущем препарат  $^{99m}\text{Tc}$ -DARPin9\_29 можно будет рассматривать в качестве перспективного дополнительного метода диагностики РМЖ с гиперэкспрессией рецептора HER2/неу.

## Список литературы / References

1. Telugu R.B., Chowhan A.K., Rukmangadha N., Patnayak R., Phaneendra B.V., Prasad B.C., Reddy M.K. Human epidermal growth factor receptor 2/neu protein expression in meningiomas: An immunohistochemical study. *J. Neurosci. Rural Pract.* 2016; 7 (4): 526–531. doi: 10.4103/0976-3147.188640
2. Zavyalova M., Vtorushin S., Krakhmal N., Saveleva O., Tashireva L., Kaigorodova E., Perelmuter V., Telegina N., Denisov E., Bragina O., Slonimskaya E., Choynzonov E. Clinicopathological features of non-specific invasive breast cancer according to its molecular subtypes. *Exp. Oncol.* 2016; 38 (2): 122–127. doi: 10.31768/2312-8852.2016.38(2):122-127
3. Romond E.H., Perez E.A., Bryant J., Suman V.J., Geyer C.E.Jr., Davidson N.E., Tan-Chiu E., Martino S., Paik S., Kaufman P.A., Swain S.M., Pisansky T.M., Fehrenbacher L., Kutteh L.A., Vogel V.G., Visscher D.W., Yothers G., Jenkins R.B., Brown A.M., Dakhil S.R., Mamounas E.P., Lingle W.L., Klein P.M., Ingle J.N., Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 1673–1684. doi: 10.1056/NEJMoa052122
4. Orlando L., Viale G., Bria E., Lutrino E.S., Sperduti I., Carbognin L., Schiavone P., Quaranta A., Fedele P., Calio C., Calvani N., Criscuolo M., Ciniere S. Discordance in pathology report after central pathology review: Implications for breast cancer adjuvant treatment. *Breast.* 2016; 30: 151–155. doi: 10.1016/j.breast.2016.09.015
5. Zahid M., Khan S., Khan R., Shireen A., Fatima S. Detection of Her2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization technique. *Pathology.* 2016; 48 (1): 163–170. doi: 10.1016/j.pathol.2015.12.447
6. Чернов В.И., Брагина О.Д., Зельчан Р.В., Медведева А.А., Синилкин И.Г., Ларькина М.С., Стасюк Е.С., Нестеров Е.А., Скуридин В.С. Меченые аналоги соматостатина в тераностике нейроэндокринных опухолей. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2017; 62 (3): 42–49.
7. Chernov V.I., Bragina O.D., Zel'chan R.V., Medvedeva A.A., Sinilkin I.G., Larkina M.S., Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Skuridin V.S. Labeled somatostatin analogues in theranostics of neuroendocrine tumors. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost' = Medical Radiology and Radiation Safety.* 2017; 62 (3): 42–49. [In Russian].
8. Chernov V.I., Medvedeva A.A., Sinilkin I.G., Zelchan R.V., Bragina O.D., Choynzonov E.L. Nuclear medicine as a tool for diagnosis and targeted cancer therapy. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (3): 25–33. [In Russian]. doi: 1682-0363-2018-1-220-231
9. Chernov V.I., Sinilkin I.G., Zelchan R.V., Medvedeva A.A., Lyapunov A.Yu., Bragina O.D., Varlamova N.V., Skuridin V.S. Experimental study of  $^{99m}\text{Tc}$ -aluminum oxide use for sentinel lymph nodes detection. *Physics of Cancer: Interdisciplinary Problems and Clinical Applications, PC 2016: Proceedings of the In-*



ternational conference on physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications. 2016; 1760: 020012. doi: 10.1063/1.4960231

9. Garousi J., Honarvar H., Andersson K.G., Mitran B., Orlova A., Buijs J., Löfblom J., Frejd F.Y., Tolmachev V. Comparative evaluation of affibody molecules for radionuclide imaging of *in vivo* expression of carbonic anhydrase IX. *Mol Pharm.* 2016; 13 (11): 3676–3687. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00502

10. Брагина О.Д., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Ларькина М.С. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований. *Бюл. сиб. мед.* 2019; 18 (3): 125–133. doi: 1682-0363-2019-3-125-133

Bragina O.D., Chernov V.I., Zelchan R.V., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Larkina M.S. Alternative scaffolds in radionuclide diagnosis of malignancies. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian medicine.* 2019; 18 (3): 125–133. [In Russian]. doi: 1682-0363-2019-3-125-133

11. Nicholes N., Date A., Beaujean P., Hauk P., Kanwar M., Ostermeier M. Modular protein switches derived from antibody mimetic proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* 2016; 29: 77–85. doi: 10.1093/protein/gzv062

12. Tolmachev V., Orlova A., Andersson K. Methods for radiolabelling of monoclonal antibodies. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1060: 309–330. doi: 10.1007/978-1-62703-586-6\_16

13. Stumpp M.T., Binz H.K., Amstutz P. DARPins: A new generation of protein therapeutics. *Drug Discov. Today.* 2008; 13 (15): 695–701. doi: 10.1016/j.drudis.2008.04.013

14. Binz H.K., Stumpp M.T., Forrer P., Amstutz P., Pluckthun A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 2003; 332: 489–503. doi:10.1016/s0022-2836(03)00896-9

15. Goldstein R., Sosabowski J., Livanos M., Leyton J., Vigor K., Bhavsar G., Nagy-Davidescu G., Rashid M., Miranda E., Yeung J., Tolner B., Plückthun A., Mather S., Meyer T., Chester K. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2015; 42 (2): 288–301. doi: 10.1007/s00259-014-2940-2

16. Boersma Y.L., Pluckthun A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011; 22: 849–857. doi: 10.1016/j.copbio.2011.06.004

17. Hanenberg M., McAfoose J., Kulic L., Welt T., Wirth F., Parizek P., Strobel L., Catterpoel S., Späni C., Derungs R., Maier M., Plückthun A., Nitsch R.M. Amyloid- $\beta$  peptide-specific DARPins as a novel class of potential therapeutics for Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 2014; 26: 27080–27089. doi: 10.1074/jbc.M114.564013

18. Hausammann S., Vogel M., Kremer J.A., Lacroix-Desmazes S., Stadler B.M., Horn M.P. Designed ankyrin repeat proteins: a new approach to mimic complex antigens for diagnostic purposes? *PLoS One.* 2013; 8: 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0060688

19. Houlihan G., Gatti-Lafronconi P., Lowe D., Holfelder F. Directed evolution of anti-HER2 DARPins by SNAP display reveals stability/function trade-offs in the selection process. *Protein Eng. Des. Sel.* 2015; 28 (9): 269–279. doi: 10.1093/protein/gzv029

20. Kramer L., Renko M., Završnik J., Turk D., Seeger M.A., Vasiljeva O., Grütter M.G., Turk V., Turk B. Non-invasive *in vivo* imaging of tumour-associated cathepsin B by a highly selective inhibitory DARPin. *Theranostics.* 2017; 8: 2806–2821. doi: 10.7150/thno.19081

21. Moody P., Chudasama V., Nathani R.I., Maruani A., Martin S., Smith M.B., Caddick S. A rapid, site-selective and efficient route to the dual modification of DARPins. *Chem. Commun. (Camb.).* 2014; 50 (38): 4898–4900. doi: 10.1039/c4cc00053f

22. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015; 55: 489–511. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654

23. Tamaskovic R., Simon M., Stefan N., Schwill M., Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) from research to therapy. *Methods Enzymol.* 2012; 503: 101–134. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654

24. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A., Tolmachev V., Deyev S.M. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled DARPinG3. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 9405. doi: 10.1038/s41598-019-45795-8

25. Брагина О.Д., Ларькина М.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Юсубов М.С., Скуридин В.С., Деев С.М., Зельчан Р.В., Булдаков М.А., Подрезова Е.В., Белоусов М.В. Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченных  $^{99m}\text{Tc}$  рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her2/neu. *Бюл. сиб. мед.* 2017; 16 (3): 25–33. doi: 1682-0363-2017-3-25-33

Bragina O.D., Larkina M.S., Stasyuk E.S., Chernov V.I., Yusubov M.S., Skuridin V.S., Deyev S.M., Zel'chan R.V., Buldakov M.A., Podrezova E.V., Belousov M.V. The development of a highly specific radiochemical compound based on labeled  $^{99m}\text{Tc}$  recombinant molecules for targeted imaging of cells with the overexpression of Her2/neu. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (3): 25–33. [In Russian]. doi: 1682-0363-2017-3-25-33

26. Vorobyeva A., Bragina O., Altai M., Mitran B., Orlova A., Shulga A., Proshkina G., Chernov V., Tolmachev V., Deyev S. Comparative evaluation of radi-



iodine and technetium-labeled DARPIn 9\_29 for radionuclide molecular imaging of HER2 expression in malignant tumors. *Contrast Media Mol. Imaging*. 2018; 2018: 6930425. doi: 10.1155/2018/6930425

27. Sandberg D., Tolmachev V., Velikyan I., Olofsson H., Wennborg A., Feldwisch J., Carlsson J., Lind-

man H., Sörensen J. Intra-image referencing for simplified assessment of HER2-expression in breast cancer metastases using the affibody molecule ABY-025 with PET and SPECT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2017; 44 (8): 1337–1346. doi: 10.1007/s00259-017-3650-3

#### **Сведения об авторах:**

**Ольга Дмитриевна Брагина**, к.м.н., ORCID: 0000-0001-5281-7758, e-mail: ungis@mail.ru

**Владимир Иванович Чернов**, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-5524-9546, e-mail: chernov@tnimc.ru

**Анна Александровна Медведева**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-5840-3625, e-mail: medvedeva@tnimc.ru

**Роман Владимирович Зельчан**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-4568-1781, e-mail: r.zelchan@yandex.ru

**Мария Сергеевна Ларькина**, к.ф.н., ORCID: 0000-0003-1176-2441, e-mail: marialarkina@mail.ru

**Сергей Михайлович Деев**, д.б.н., проф., член-корр. РАН, ORCID: 0000-0002-3952-0631, e-mail: biomem@mail.ru

**Владимир Максимилианович Толмачев**, проф., ORCID: 0000-0002-6122-1734, e-mail: Vladimir.tolmachev@igp.uu.se

#### **Information about the authors:**

**Olga D. Bragina**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-5281-7758, e-mail: ungis@mail.ru

**Vladimir I. Chernov**, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-5524-9546, e-mail: chernov@tnimc.ru

**Anna A. Medvedeva**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-5840-3625, e-mail: medvedeva@tnimc.ru

**Roman V. Zelchan**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-4568-1781, e-mail: r.zelchan@yandex.ru

**Maria S. Larkina**, candidate of pharmaceutical sciences, ORCID: 0000-0003-1176-2441, e-mail: marialarkina@mail.ru

**Sergei M. Deyev**, doctor of biological sciences, professor, corresponding member of RAS, ORCID: 0000-0002-3952-0631, e-mail: biomem@mail.ru

**Vladimir M. Tolmachev**, professor, ORCID: 0000-0002-6122-1734, e-mail: Vladimir.tolmachev@igp.uu.se

*Поступила в редакцию* 20.04.2020

*После доработки* 05.06.2020

*Принята к публикации* 24.06.2020

*Received* 20.04.2020

*Revision received* 05.06.2020

*Accepted* 24.06.2020