

О.Д. Брагина¹, А.Г. Воробьева⁵, В.М. Толмачев⁵, А.М. Орлова⁵, В.И. Чернов^{1,2}, С.М. Деев^{2,4},
Г.Н. Прошкина⁴, А.А. Шульга⁴, М.С. Ларькина³, А.А. Медведева¹, Р.В. Зельчан¹

IN VITRO И IN VIVO ОЦЕНКА РАДИОХИМИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ МЕЧЕННОГО ^{99m}Tc КАРКАСНОГО БЕЛКА DARPIn9_29 ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ Her2/neu

1. Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр, Томск;
2. Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск;
3. Сибирский государственный медицинский университет, Томск;
4. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва;
5. Уппсальский университет, Уппсала, Швеция

Контактное лицо: Брагина Ольга Дмитриевна rungis@mail.ru

РЕФЕРАТ

Введение: Для обеспечения направленной доставки радионуклидов при диагностике злокачественных новообразований активно используют молекулы, связывающиеся со специфическим «таргетным» антигеном. В последние годы исследуется возможность применения для этих целей адресных молекулярных структур DARPIn (Design Ankyrin Repeat Protein). Одной из наиболее изучаемых молекулярных мишеней по-прежнему остается рецептор эпидермального роста Her2/neu, гиперэкспрессия которого определяется на поверхности опухолевых клеток.

Цель: Изучение эффективности радиохимического соединения на основе меченного ^{99m}Tc адресных молекул DARPIn9_29 для радионуклидной диагностики злокачественных опухолей с гиперэкспрессией Her2/neu.

Материал и методы: Последовательность DARPIn9_29 была амплифицирована с плазмиды pET-DARP-6HIS для экспрессии гена DARPIn9_29-His6 в клетках *E. coli*. Элюат ^{99m}TcO₄⁻ (400–500 мкл, 4 ГБк) был добавлен в набор для приготовления трикарбонила технеция [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ (CRS Kit, Швейцария) с последующей инкубацией при температуре 100 °С в течение 20 мин. После инкубации 40 мкл [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ было добавлено к 168 мкг DARPIn9_29 в 100 мкл PBS (натрий-фосфатный буфер) с последующей инкубацией при температуре 40 °С в течение 60 мин. Радиохимические выход и чистота определялись с помощью тонкослойной радиохроматографии (ТСРХ), очищение проводилось с использованием очищающих колонок NAP-5 (GE Healthcare, Швеция). Для изучения специфичности исследуемого радиофармацевтического соединения использовались клеточные линии с различным уровнем экспрессии Her2/neu: SKOV-3 > BT474 >> DU-145. Для проведения *in vitro* исследования использовалась экспрессирующая Her2/neu клеточная линия SKOV-3. Исследование проводилось через 6 ч после введения препарата.

Результаты: Радиохимический выход составил 72 ± 8 %, радиохимическая чистота после очищения – 98,7 ± 1,0 %. Показатели стабильности в растворе PBS через 1 ч составили 99,8 ± 0,2; через 3 ч – 98,2 ± 0,1. Данные *in vitro* исследований продемонстрировали, что накопление изучаемого соединения прямо пропорционально уровню экспрессии Her2/neu клеток, при этом при блокировании рецепторов избытком немеченого протеина отмечается значительное снижение связывания в группе клеток. Данные по биораспределению и ОФЭКТ/КТ в организме животного BALB/c nu/nu через 6 ч после введения радиофармпрепарата продемонстрировали быстрое выведение соединения из кровотока и высокую аккумуляцию в опухоли, печени, почках и мочевом пузыре.

Заключение: Проведенные исследования продемонстрировали высокие показатели радиохимического выхода и чистоты, а также стабильность изучаемого соединения. Результаты *in vitro* и *in vivo* анализа показали специфичность и аффинность радиофармпрепарата к рецептору Her2/neu на поверхности опухолевых клеток. Выявленная при *in vivo* исследованиях высокая аккумуляция препарата в печени и почках, вероятно, обусловлена липофильностью ^{99m}Tc(CO)₃⁻, связанной с гексагистидиновым концом, и свидетельствует об ограничении его дальнейшего клинического использования в оценке состояния указанных выше органов, что потребует дополнительных методов диагностики, а также возможной модификации химической структуры.

Ключевые слова: злокачественные опухоли, Her2/neu, радионуклидная диагностика, DARPIn9_29

Для цитирования: Брагина О.Д., Воробьева А.Г., Толмачев В.М., Орлова А.М., Чернов В.И., Деев С.М., Прошкина Г.Н., Шульга А.А., Ларькина М.С., Медведева А.А., Зельчан Р.В. *In vitro* и *in vivo* оценка радиохимического соединения на основе меченного ^{99m}Tc каркасного белка DARPIn9_29 для молекулярной визуализации злокачественных образований с гиперэкспрессией Her2/neu. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(1):37–41.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-1-37-41

Введение

В последние годы все большую популярность получают таргетные радионуклидные методы диагностики злокачественных заболеваний, обладающие высокой специфичностью к различным молекулярным мишеням и позволяющие визуализировать опухолевые очаги различных размеров – как основной опухолевый узел, так и метастатические очаги [1–3]. Для обеспечения направленной доставки радионуклидов

необходимо использование молекул, имеющих ряд обязательных характеристик, таких как связывание исключительно с «таргетным» антигеном для специфической локализации, отсутствие иммуногенности, стабильность и возможность быстрой химической модификации для проведения процессов мечения [4–6]. Также для медицинской визуализации существенным является скорость связывания с мишенью и быстрое удаление несвязавшихся молекул из организма паци-

ента для достижения высокого качества визуализации опухоли и сокращения временного промежутка между инъекцией и началом исследования [7–9]. В настоящее время для этих целей используются новые молекулярные структуры, получившие название «альтернативных каркасных белков» и отвечающие всем требованиям оптимальной доставки радионуклида к опухолевым клеткам [10, 11]. 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, а также значительно более низкая стоимость производства, обусловленная их экспрессией в бактериальных средах [12, 13].

Одной из наиболее изучаемых молекулярных мишеней по-прежнему остается рецептор эпидермального роста Her2/neu, гиперэкспрессия которого определяется на поверхности опухолевых клеток (преимущественно рака молочной железы, режа рака яичников, желудка, простаты и пр.) и характеризуется неблагоприятным прогнозом относительно безрецидивной и общей выживаемости [14–17].

Целью настоящего исследования является изучение эффективности препарата на основе меченных ^{99m}Tc адресных молекул DARPIn9_29 для радионуклидной диагностики злокачественных опухолей с гиперэкспрессией Her2/neu.

Материал и методы

Кодирующая последовательность DARPIn9_29 была амплифицирована с плазмиды pET-DARP-6HIS в клетках *E. coli* лабораторией молекулярной онкологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством проф. Деева С.М. (рис. 1).

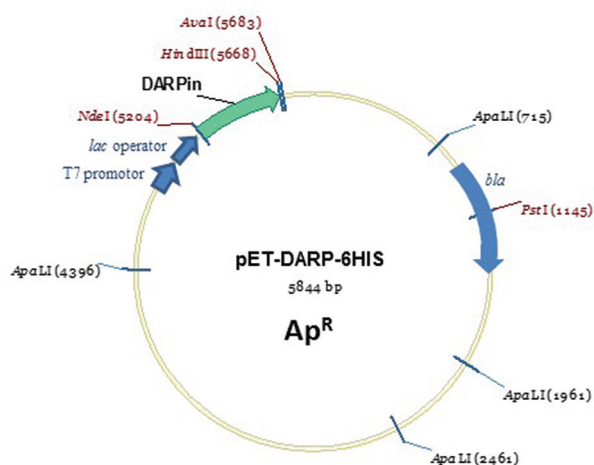


Рис. 1. Схема плазмиды pET-DARP-6HIS для экспрессии гена DARPIn9_29-His6 в клетках *E. coli*

Fig. 1. pET-DARP-6HIS plasmid scheme for DARPIn9_29-His6 gene expression in *E. coli* cells

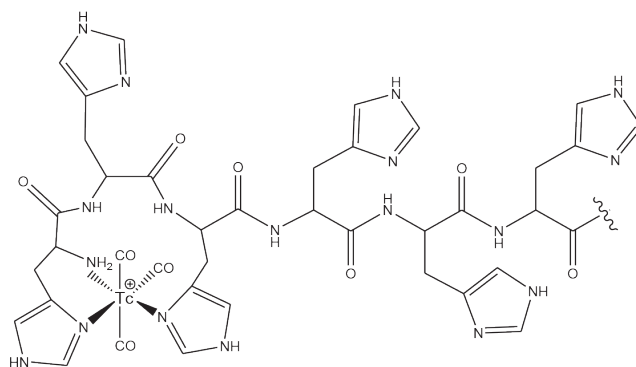


Рис. 2. Структура меченого через гексагистиридиновый конец $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPIn9_29}$

Fig. 2. The structure labeled using exogetically the end of the $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPIn9_29}$

Мечение и определение стабильности

Для приготовления трикарбонила технеция $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ нами использовался набор CRS Isolink (Center for Radiopharmaceutical Science, Paul Scherrer Institute, Villigen, Швейцария). Элюат $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (400–500 мкл, 4 ГБк) добавлялся в набор с последующей инкубацией при температуре 100 °C в течение 20 мин. После инкубации 40 мкл трикарбонила технеция было добавлено к 168 мкг DARPIn9_29 в 100 мкл PBS (натрий-фосфатный буфер) и инкубировано при температуре 40 °C в течение 60 мин (рис. 2).

Радиохимический выход и чистоту мы определяли с помощью тонкослойной радиохроматографии (TCPX), очищение проводилось с использованием колонок NAP-5 (GE Healthcare, Швеция). Тест на стабильность выполняли при инкубации исследуемого соединения в растворе PBS (натрий-фосфатный буфер) при комнатной температуре в течение 1 и 3 ч, анализ выполнялся методом TCPX. Анализ хроматограмм мы проводили с использованием хроматографа Hitachi Chromaster HPLC systems с радиоактивным детектором. Радиоактивность измеряли с помощью автоматизированного гамма-спектрометра 1480 Wizard (Wallac, Финляндия).

Клеточные линии и условия культивирования

Для изучения специфичности исследуемого радиофармацевтического соединения нами использовались клеточные линии с различным уровнем экспрессии Her2/neu: SKOV-3 > BT474 >> DU-145. Каждую клеточную линию высевали в 6 чашек Петри диаметром 3 см ($1,2 \times 10^6$ клеток на чашку) за 2 дня до исследования до образования монослоя. На первом этапе мы выполняли блокирование рецептора Her2/neu путем добавления немеченого DARPIn9_29 (500 мкл, 1000 нмоль) в половину чашек Петри каждой клеточной линии с последующей инкубацией в течение 30 мин при температуре 37 °C. Затем в каждую чашку добавлялось меченое соединение (500 мкл, 20 нмоль) с последующей инкубацией в течение 30 мин при температуре 37 °C.

Таблица 1

Биораспределение $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$ в организме BALB/c nu/nu
Bio-distribution of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$ in the body of BALB/c nu/nu

Исследуемые органы	Аккумуляция $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$, % от введенной дозы/г
Кровь	$0,8 \pm 0,1$
Железистая ткань	$1,7 \pm 0,4$
Легкие	$1,7 \pm 0,2$
Печень	27 ± 4
Селезенка	$8,4 \pm 3,0$
Желудок	$1,3 \pm 0,1$
Почки	80 ± 11
Опухоль	$2,9 \pm 0,7$
Мышцы	$0,5 \pm 0,1$
Кости	$2,0 \pm 0,8$
Желудочно-кишечный тракт	$5,3 \pm 0,9$

Исследование на животных

Для проведения *in vivo* исследования нами использовалась экспрессирующая Her2/neu клеточная линия SKOV-3, которая в количестве 5×10^7 клеток в 100 мкл среды подкожно вводилась в правую заднюю конечность самкам мышей BALB/c nu/nu. Исследования выполнялись через 2,5 нед после имплантации, средний вес животных составил 16 ± 1 г, средний вес опухоли – $0,26 \pm 0,16$ г.

Всем мышам проводилась инъекция препарата $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$ (4 мкг, 4,4 МБк), через 6 ч после внутривенного введения выполнялось исследование с использованием ОФЭКТ/КТ-сканера NanoScan (Mediso Medical Imaging System, Венгрия) после предварительной наркотизации, проводимой путем ингаляционного наркоза этиловым эфиром.

Содержание животных и уход за ними производились на основании законодательных и нормативных документов, регламентирующих работу с лабораторными животными, а также согласно этическо-правовым нормам Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Вывод животных из эксперимента осуществлялся путем цервикальной дислокации.

Результаты исследования

При проведении мечения DARPin9_29 трикарбонилном технеции радиохимический выход составил 72 ± 8 %, радиохимическая чистота после очищения – $98,7 \pm 1,0$ %. Показатели стабильности в растворе PBS через 1 ч составили $99,8 \pm 0,2$; через 3 ч – $98,2 \pm 0,1$.

Данные *in vitro* исследований продемонстрировали, что накопление изучаемого соединения прямо пропорционально уровню экспрессии Her2/neu клеток. Показано, что при блокировании рецепторов избытком немеченого протеина отмечается значительное снижение связывания в группе клеток (рис. 3).

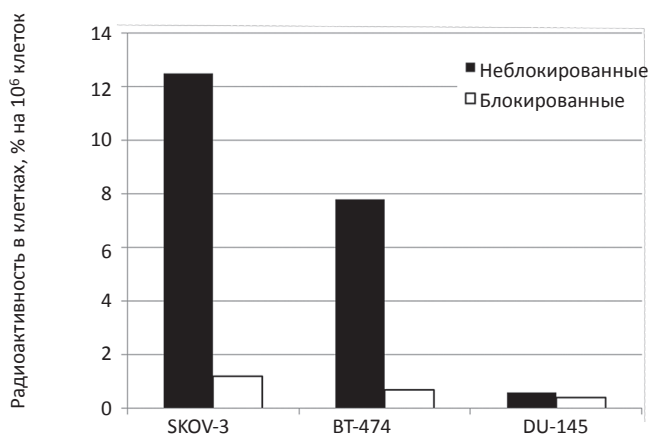


Рис. 3. Изучение специфической активности $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$ на клеточных линиях с гиперэкспрессией Her2/neu

Fig. 3. Study of the specific activity of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$ on cell lines with Her2/neu overexpression

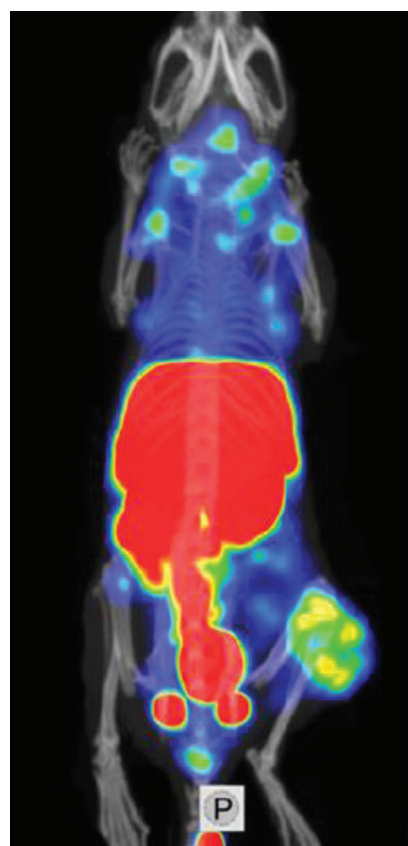


Рис. 4. Визуализация Her2/neu экспрессирующей опухоли при использовании $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$ через 6 ч после введения

Fig. 4. Visualization of Her2/neu expressing tumor using $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$ 6 hours after administration

Данные по биораспределению исследуемого препарата в организме животного BALB/c nu/nu через 6 ч после введения радиофармпрепарата представлены табл. 1. Было отмечено быстрое выведение радиофармпрепарата из кровотока у всех исследуемых жи-

вотных. Наряду с этим была выявлена высокая аккумуляция радиофармпрепарата в печени и почках.

Результаты проведения ОФЭКТ/КТ для лабораторных животных подтвердило результаты биораспределения исследуемого соединения, при этом опухоль с гиперэкспрессией Her2/neu визуализировалась во всех случаях, также отмечалось отчетливое накопление $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$ в печени, почках и мочевом пузыре (рис. 4).

Заключение

Проведенных нами исследований продемонстрировали высокие показатели радиохимического выхода

и чистоты, а также стабильность изучаемого соединения $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DARPin9_29}$. Результаты *in vitro* и *in vivo* анализа показали специфичность и аффинность радиофармпрепарата к рецептору Her2/neu на поверхности опухолевых клеток. Выявленная при *in vivo* исследованиях высокая аккумуляция препарата в печени и почках, мы связываем с липофильностью $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-гистидинового}$ конца и свидетельствует об ограничении его дальнейшего клинического использования в оценке состояния указанных выше органов, что потребует дополнительных методов диагностики, а также возможной модификации химической структуры.

Nuclear Medicine

Medical Radiology and Radiation Safety. 2020. Vol. 65. No. 1. P. 37–41

***In vitro* and *in vivo* Evaluation of the Radiochemical Compound Based on ^{99m}Tc Technetium Labelled DARPin9_29 for Molecular Visualization of Malignancies Overexpressing Her2/neu**

O.D. Bragina¹, A.G. Vorobyeva⁵, V.M. Tolmachev⁵, A.M. Orlova⁵, V.I. Chernov^{1,2}, S.M. Deyev^{2,4}, G.N. Proshkina⁴, A.A. Shulga⁴, M.S. Larkina³, A.A. Medvedeva¹, R.V. Zelchan¹

1. Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science, Tomsk, Russia.
E-mail: rungis@mail.ru

2. National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

3. Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

4. Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
5. Uppsala University, Uppsala, Sweden

ABSTRACT

Purpose: Evaluation of a radiopharmaceutical based on ^{99m}Tc -labeled targeted molecules DARPin9_29 for radionuclide diagnostics of malignancies with Her2/neu overexpression.

Material and methods: The DARPin9_29 sequence was amplified from the plasmid pET-DARP-6HIS for the DARPin9_29-His6 gene expression in *E. coli* cells. The eluent of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (400–500 μl , 4 GBq) was added to the kit and incubated at a temperature of 100 °C for 20 minutes. After incubation, 40 μl of tricarbonyl technetium was added to 168 μg of DARPin9_29 in 100 μl of PBS (sodium phosphate buffer), followed by incubation at 40 °C for 60 minutes. The radiochemical yield and purity were determined by thin layer radiochromatography, the purification was performed using NAP-5 cleansing columns (GE Healthcare). Cell lines with different levels of Her2/neu expression were used: SKOV-3 > BT474 > DU-145 for the determination of the radiopharmaceutical specificity. Her2/neu expressing cell line SKOV-3 was used for *in vitro* study. The study was conducted 6 hours after the administration of the drug.

Results: The radiochemical yield was $72 \pm 8\%$, the radiochemical purity after purification was $98.7 \pm 1.0\%$. The stability in PBS (phosphate buffered saline) solution after 1 hour was 99.8 ± 0.2 ; after 3 hours – 98.2 ± 0.1 . *In vitro* studies showed that the accumulation of explored compound was directly proportional to the level of Her2/neu expression in cells, while blocking the receptors with an excess of unlabeled protein showed a significant reduction in binding in the group of cells. Data on biodistribution and SPECT/CT in the body of the animal BALB/c nu/nu demonstrated rapid removal of the compound from the blood stream and high accumulation in the liver, kidney and bladder 6 hours after the introduction of the radiopharmaceutical.

Conclusion: The studies demonstrated high radiochemical yields and purity, as well as stability of the studied compound. The results of *in vitro* and *in vivo* analysis showed the specificity and affinity of the radiopharmaceutical to the Her2/neu receptor on the surface of tumor cells. The high accumulation of the drug in the liver and kidneys, detected in *in vivo* studies, is probably due to the lipophilicity of the $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-histidine}$ tag and indicates the limitation of its further clinical use in assessing the condition of the above organs, which will require additional diagnostic methods, as well as possible modification chemical structure.

Key words: malignancies, Her2/neu, radionuclide diagnostics, DARPin9_29

For citation: Bragina OD, Vorobyeva AG, Tolmachev VM, Orlova AM, Chernov VI, Deyev SM, Proshkina GN, Shulga AA, Larkina MS, Medvedeva AA, Zelchan RV. *In vitro* and *in vivo* Evaluation of the Radiochemical Compound Based on ^{99m}Tc Technetium Labelled DARPin9_29 for Molecular Visualization of Malignancies Overexpressing Her2/neu. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(1):37–41. (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-1-37-41

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Чернов ВИ, Медведова АА, Синилкин ИГ, и др. Ядерная медицина в диагностике и адресной терапии злокачественных новообразований. Бюллетень сибирской медицины. 2018;17(1):220–31. [Chernov VI, Medvedeva AA, Sinilkin IG, Zelchan RV, Bragina OD, Choyznzonov EL. Nuclear medicine

as a tool for diagnosis and targeted cancer therapy. Bulletin of Siberian Medicine. 2018;17(1):220–231. (In Russ.).]

2. Чернов ВИ, Брагина ОД, Синилкин ИГ, и др. Радиоиммунотерапия: современное состояние проблемы. Вопросы онкологии. 2016;62(1):24–30. [Chernov VI, Bragina OD, Sinilkin IG, Medvedeva AA, Zelchan RV

- Radioimmunotherapy: current state of the problem. *Oncology issues*. 2016;62(1):24-30. (In Russ.).
3. Брагина ОД, Чернов ВИ, Зельчан РВ, и др. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных заболеваний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;3(18):125-133. [Bragina OD, Chernov VI, Zelchan RV, Sinilkin IG, Medvedeva AA, Larkina MS. Alternative scaffolds in radionuclide diagnosis of malignancies. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(3):125-133. (In Russ.).]
 4. Чернов ВИ, Брагина ОД, Синилкин ИГ, и др. Радиоиммунотерапия в лечении злокачественных образований. *Сибирский онкологический журнал*. 2016;15(2):101-6. [Chernov VI, Bragina OD, Sinilkin IG, Medvedeva AA, Zel'chan RV Radioimmunotherapy in the treatment of malignancies. *Siberian journal of oncology*. 2016;15(2):101-6. (In Russ.).]
 5. Tamaskovic R, Simon M, Stefan N, Schwill M, Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin) from research to therapy. *Methods Enzymol*. 2012; 503:101-34.
 6. Boersma YL, Pluckthun A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2011; 22:849-57.
 7. Брагина ОД, Ларькина МС, Стасюк ЕС, и др. Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченных ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/ neu. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017;16(3):25-33. [Bragina OD, Larkina MS, Stasyuk ES, Chernov VI, Yusubov MS, Skuridin VS, et al. Development of highly specific radiochemical compounds based on ^{99m}Tc -labeled recombinant molecules for targeted imaging of cells overexpressing Her-2/ neu. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017;16(3):25-33. (In Russ.).]
 8. Vorobyeva A, Bragina O, Altai M, Mitran B, Orlova A, Shulga 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; 2018: 6930425.
 9. Goldstein R, Sosabowski J, Livanos M, Leyton J, Vigor K, Bhavsar G, et al. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42(2):288-301.
 10. Lindbo S, Garousi J, Mitran B, Altai M, Buijs J, Orlova A, et al. Radionuclide Tumor Targeting Using ADAPT Scaffold Proteins: Aspects of Label Positioning and Residualizing Properties of the Label. *J Nucl Med*. 2018;59(1):93-9.
 11. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015; 55:489-511.
 12. Garousi J, Honarvar H, Andersson KG, Mitran B, Orlova A, Buijs J, et al. Comparative Evaluation of Affibody Molecules for Radionuclide Imaging of in vivo Expression of Carbonic Anhydrase IX. *Mol Pharm*. 2016 Nov 7;13(11):3676-87.
 13. Nicholes N, Date A, Beaujean P, Hauk P, Kanwar M, Ostermeier M. Modular protein switches derived from antibody mimetic proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2016; 29:77-85.
 14. Kramer L, Renko M, Završnik J, Turk D, Seeger MA, Vasiljeva O, et al. Non-invasive in vivo imaging of tumour-associated cathepsin B by a highly selective inhibitory DARPin. *Theranostics*. 2017; 8:2806-21.
 15. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse a survival with amplification of the Her-2/neu oncogenes. *Science*. 1987; 235:177-82.
 16. Zavyalova M, Vtorushin S, Krakhmal N, Savelieva O, Tashireva L, Kaigorodova E, et al. Clinicopathological features of nonspecific invasive breast cancer according to its molecular subtypes. *Experimental Oncology*. 2016;38(2):122-27.
 17. Vorobyeva A, Garousi J, Tolmachev V, Schulga A, Konovalova E, Deyev SM, et al. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of ^{99m}Tc -labeled DARPinG3. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 9405.
 18. Чернов ВИ, Брагина ОД, Синилкин ИГ, и др. Радионуклидная тераностика злокачественных образований. *Вестник рентгенологии и радиологии*. 2016;97(5):306-13. [Chernov VI, Bragina OD, Sinilkin IG, Medvedeva AA, Zel'chan RV Radionuclide teranostic of malignancies. *Journal of Radiology and Nuclear Medicine*. 2016;97(5):306-13. (In Russ.).]

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполняется в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования радиофармацевтического препарата на основе меченных ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией Her-2/neu».

Financing. The research is carried out within the framework of the Federal target program «Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond» on the topic «Preclinical research of a radiopharmaceutical drug based on ^{99m}Tc -labeled recombinant targeted molecules for radionuclide diagnostics of cancer diseases with hyperexpression of Her-2/neu».

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 28.05.2018. **Принята к публикации:** 11.12.2019.

Article received: 28.05.2018. **Accepted for publication:** 11.12.2019.