М.С. Воронцова, Т.А. Кармакова, А.А., Панкратов, А.Д. Каприн

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ ТАРГЕТНОЙ РАДИОНУКЛИДНОЙ ТЕРАПИИ

Московский научно-исследовательский онкологический институт (МНИОИ) имени П.А.Герцена, Москва

Контактное лицо: Татьяна Анатольевна Кармакова, e-mail: kalmar123@yandex.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Введение
1. Особенности адресной доставки терапевтических радионуклидов
2. Дизайн препаратов для таргетной радионуклидной терапии (ТРНТ)
   2.1 Радионуклиды
   2.2 Синтез радиоконъюгатов
   2.3 Векторные носители
3. Субклеточное нацеливание радионуклидов
4. Дозиметрия при ТРНТ
Заключение

Ключевые слова: *солидные злокачественные опухоли, таргетная радионуклидная терапия*

Для цитирования: Воронцова М.С., Кармакова Т.А., Панкратов А.А., Каприн А.Д. Современные тенденции развития таргетной радионуклидной терапии //Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2021.Т.66. №6. С. 63–70

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-6-63-70

Введение

Радионуклидная терапия (РНТ) представляет собой особый вид радиационного воздействия, при котором облучение производится путем введения радиофармацевтического препарата (РФП) непосредственно в организм пациента. Преимуществом РНТ, по сравнению с дистанционным или контактным облучением, является возможность системного ее применения, что позволяет проводить лечение при диссеминированном опухолевом процессе, а также воздействовать не только на определяемые, но и на скрытые очаги опухолевого поражения [1]. Стремление избежать избыточного облучения нормальных тканей, минимизировать уровень облучения всего тела больного и максимально использовать терапевтический потенциал радионуклидов делает предпочтительным использование РФП, способных накапливаться и удерживаться в очаге опухолевого поражения. Специфика решения этой задачи привела к появлению активно развивающегося направления в рамках ядерной медицины – таргетной РНТ (ТРНТ) [1, 2].

Некоторые радионуклиды обладают физиологическим сродством к определенным тканям организма. Так, йод в норме активно поглощается фолликулярными клетками щитовидной железы, в которых происходит синтез йод-содержащих гормонов, и это свойство лежит в основе использования радиоактивных изотопов йода (йод-131, йод-125, йод-123) для визуализации узловых образований и адьювантного лечения при дифференцированном раке щитовидной железы [1]. Радиоактивные химические аналоги кальция (стронций-89, радий-223) при введении в организм в виде хлоридов накапливаются в очагах с патологически усиленным минеральным метаболизмом, что сделало возможным успешное применение таких РФП с паллиативной целью у больных с метастазами в кости [1, 3]. Однако подавляющее большинство опухолей не обладают способностью избирательно захватывать те или иные химические элементы, и для концентрирования радионуклидов в клетках таких новообразований необходимы вспомогательные средства нацеленной доставки.

В настоящем обзоре рассмотрены основная проблематика и актуальные направления развития современных исследований в области противоопухолевой ТРНТ.

1. Особенности адресной доставки терапевтических радионуклидов

В самом общем виде радиоконъюгат для ТРНТ состоит из радионуклида – источника радиоактивного излучения, и вектора-фармакофора, который определяет взаимодействие РФП со специфической биологической мишенью.

Характеристики радионуклида должны обеспечить, с одной стороны, избирательное и необратимое повреждение ткани-мишени, с другой стороны – минимальное системное воздействие, минимальное поражение органов выведения и прилежащих к опухоли нормальных тканей. Вектор в составе таргетированной конструкции должен быть способным достичь мишени при введении в организм больного, с достаточной специфичностью провзаимодействовать с этой мишенью и удержаться в очаге поражения на время, необходимое для реализации радиотоксического действия РФП. Соединение вектора и радионуклида в единую конструкцию не должно нарушить биологические свойства вектора и стабильность радиоконъюгата как *in vitro,* так в условиях биологического окружения. Совокупность свойств радионуклида, вектора, а также способа их соединения будет определять радиобиологические и физико-химические свойства РФП, оптимальную лекарственную форму и способ введения препарата, его фармакокинетику и биораспределение в организме, эффективные дозировки и режимы применения, а также потенциальные побочные эффекты.

Способы направленного лекарственного воздействия традиционно подразделяют на две стратегии: активную и пассивную доставку [4]. Стратегия активной доставки предполагает использование векторов-носителей, способных специфически взаимодействовать с молекулярными мишенями на поверхности опухолевых клеток. Такими векторами могут служить антитела, естественные и синтетические лиганды рецепторов, субстраты ферментов, прометаболиты и пр., для которых существует соответствующий функциональный партнер-мишень на поверхности опухолевых клеток. Специфические свойства вектора, в идеале, могут обеспечить не только взаимодействие с определенными клетками, но и последующий внутриклеточный транспорт радионуклида к определенным компартментам и структурам. Пассивная

доставка подразумевает накопление носителя в очаге солидного опухолевого поражения за счет аномальной микрососудистой сети опухоли, что создает условия для усиленного поступления препарата из кровотока в интерстициальное пространство и замедленного его выхода из ткани (Enhanced Permeability and Retention effect, EPR-эффект) [5]. По механизму пассивного транспорта в опухоли удерживаются, например, введенные в кровоток наноразмерные частицы.

Выделение категорий пассивной и активной таргетной доставки можно считать достаточно условным. При введении в организм любого таргетированного препарата как такового «нацеливания» вектора на очаг поражения не происходит. Активное взаимодействие вектора и мишени способствует лишь удержанию носителя и связанного с ним лекарственного агента в опухолевой ткани. При этом для осуществления этого взаимодействия необходимо, чтобы вектор и мишень оказались в непосредственной пространственной близости, на расстоянии не более 0,5 нм, а условия для такого контакта создаются, в том числе, благодаря EPR-эффекту [5].

Разработка методов ТРНТ, особенно тех, которые предполагается использовать для лечения солидных новообразований, закономерно сталкивается с известными проблемами реализации концепции направленного транспорта. Так, для клеток подавляющего большинства злокачественных новообразований на сегодняшний день не выявлены молекулярные мишени, с достаточно высокой специфичностью отличающие их от нормальных клеток [6]. При системном введении препарата существует вероятность взаимодействия векторного носителя с белками, липопротеинами и клетками крови, необходимость преодоления на пути к опухоли тканевых барьеров (эндотелий, базальные мембраны, межклеточное вещество и клетки стромы). Выбор потенциально удачной пары вектор-мишень не исключает необходимости учитывать сложность структурной организации опухолевой ткани, ее гетерогенность по наличию мишени на клетках, количество молекул-мишеней на опухолевых клетках, силу и специфичность взаимодействия вектора с мишенью в условиях биологического микроокружения, способность комплекса вектор – мишень к интернализации, а также естественный метаболизм векторной конструкции [7, 8].

Современные подходы к разработке радиоконъюгатов для ТРНТ направлены на преодоление этих ограничений и включают в себя исследование потенциальных мишеней и соответствующих векторов специфической доставки, оптимизацию структурного дизайна носителей, изучение преимуществ использования новых источников корпускулярного ионизирующего излучения.

2. Дизайн препаратов для ТРНТ

2.1. *Радионуклиды*

Развитие ядерных технологий сделало сегодня доступным достаточно широкий спектр потенциальных терапевтических радионуклидов, обладающих различными физическими и радиобиологическими свойствами. Радионуклидные источники высокоэнергетических отрицательно заряженных β-частиц (^{131}I, ^{90}Y, ^{177}Lu, $^{89/90}$Sr, ^{153}Sm, $^{186/188}$Re, ^{67}Cu и др.) считаются наиболее предпочтительными для существующих вариантов ТРНТ и используются в подавляющем большинстве существующих РФП [1]. Длина пробега β^--частиц в биологических тканях (0,2 – 2 мм) и относительно высокая энергия излучения (0,05 – 2,5 МэВ) может обеспечивать поражение множества близко расположенных клеток (эффект «перекрестного огня»). Это снижает необходимость нацеливания радионуклида на каждую отдельно взятую клетку-мишень, что важно при необходимости воздействовать на солидное новообразование [8, 9]. Однако разброс пробегов β-частиц, низкая величина линейной передачи энергии (ЛПЭ) на большей части этого пути (0,2 кэВ/мкм) приводят к необходимости использовать β-эмиттеры относительно высоких активностей. Кроме того, зависимость биологической эффективности радиационного поражения от наличия кислорода снижает эффективность поражения в гипоксических участках солидной опухоли.

В последние годы все большее внимание привлекает к себе возможность использования для ТРНТ радионуклидов – источников α-частиц (^{213}Bi, ^{211}At, ^{225}Ac, ^{223}Ra, ^{212}Pb). Считается, что преимущественным показанием к применению таргетированых α-эмиттеров может быть нацеливание радиационного воздействия на микрометастазы и отдельные злокачественные клетки [10]. Высокоэнергетические α-частицы (энергия изучения 2 – 10 МэВ, ЛПЭ – от 80 до 300 кэВ/мкм), производят плотно ионизирующие треки с высоким поражающим эффектом, биологическая эффективность которого минимально зависит от концентрации кислорода. В то же время, из-за короткого пути пробега α-частиц в тканях (50 – 100 мкм) существует необходимость сосредоточения α-эмиттеров непосредственно в клетках-мишенях, что требует использования достаточно специфичных векторных носителей, желательно способных к интернализации клетками.

В отдельную группу потенциальных терапевтических радиоизотопов выделяют радионуклиды, при радиоактивном распаде которых, помимо γ-квантов, образуется особый вид корпускулярного излучения – электроны Оже (^{123}I, ^{111}In, ^{67}Ga и др.). Электроны Оже обладают низкой энергией (10 эВ – 10 кэВ), но при этом характеризуются сравнительно высокой величиной ЛПЭ, которая значительно выше, чем у β^--частиц (4 – 26 кэВ/мкм). Вследствие короткого пробега электронов Оже в ткани (2 – 500 нм) в непосредственной близости от радионуклида-источника возникает область очень высокой плотности ионизации и формируется поражающий массив активных радикалов. Благодаря этим особенностям электроны Оже считаются идеальным инструментом для создания повреждающей дозы радиации в пределах объема опухоли, при практически полном исключении воздействия радиации на окружающие нормальные ткани [11]. Однако условием реализации их терапевтического потенциала является проникновение источника излучения к критической мишени клетки – в непосредственную близость к ядерной ДНК [12, 13]. Кроме того, эти радионуклиды являются достаточно мощным источником сопутствующего гамма-излучения, оказывающего клинически значимую лучевую нагрузку на нормальные органы и ткани всего тела пациента.

При выборе терапевтического радионуклида, помимо типа и энергии излучения, учитываются период его полураспада (оптимальная продолжительность – от нескольких часов до нескольких дней), а также характеристики дочерних продуктов распада. Предпочтение, как правило, отдают источникам корпускулярного излучения, образующим стабильные нуклиды или короткоживущие радиоизотопы, хотя следует отметить, что в последние годы обращают внимание на возможные преимущества применения в медицинских целях так называемых «*in vivo* генераторов» – b^-- и α-эмиттеров, образующих при распаде радиационно активные дочерние продукты (^{212}Pb / ^{212}Bi, ^{213}Bi / ^{209}Pb, ^{112}Pd / ^{112}Ag и др.) [14].

2.2. ***Синтез радиоконъюгатов***

Свойства некоторых радионуклидов позволяют непосредственно включать их в структуру фармакофора. Примером такого подхода служит аналог норадреналина – мета-йодбензилгуанидин, содержащий радиоактивный йод (^{131}I-MIBG), или остеотропные РФП, несущие самарий-153 или рений-188 в составе стабильных комплексов с хелаторами-фосфонатами (^{153}Sm-EDTMP, ^{153}Sm-оксабифор, ^{188}Re-HEDT) [1]. Однако создание РФП на основе большинства других потенциальных векторов требует присоединения соответствующей структуры, удерживающей радионуклид. Такими структурами, как правило, являются бифункциональные макроциклические или ациклические молекулы, образующие координационные связи с атомами металлов и несущие реакционно-способные группы для образования ковалентной химической связи с биологическими молекулами или промежуточным линкером (DOTA[1], NOTA, TETA, DTPA и их производные; десферроксамин В и др.) [15].

Свойства хелатирующего лиганда определяют способность носителя образовывать комплексы с теми или иными атомами металлов. Таким образом, выбор хелатора должен быть сообразен предполагаемому диагностическому и/или терапевтическому назначению радиоконъюгата. Кроме того, структура комплекса хелатор-линкер и характер их соединения с вектором могут влиять на гибкость конструкции в целом, ее термодинамическую стабильность *in vitro,* гидрофильность и биохимическую стабильность *in vivo*. Все эти характеристики могут отражаться на особенностях фармакокинетики и биораспределения радиоконъюгата [15]. Таким образом, разработка оптимального сочетания радионуклида, хелатирующего лиганд и вектор, а также способа их соединения является важным и крайне трудоемким этапом в создании таргетных РФП.

2.3. ***Векторы***

Мишенью для таргетных лекарственных или диагностических средств, по определению, являются структурные или функциональные особенности злокачественного новообразования, которые в той или иной степени отличают опухоль от нормальных клеток и тканей организма: повышенная экспрессия на опухолевых клетках рецепторов факторов роста или гормонов, молекул адгезии, тканеспецифических антигенов или ферментов; высокая плотность новообразованных сосудов; гипоксия опухолевой ткани; повышенная метаболическая активность и т.д. В качестве вектора, таким образом, могут быть использованы самые разные по своей природе и свойствам биологически активные молекулы, имеющие тропность к соответствующей мишени.

Антитела и их производные. Возможность применения моноклональных антител (мАТ) и их Fab_2-фрагментов для радиоиммунолокализации злокачественных опухолей и радиотерапевтического воздействия активно исследовалась с первых лет открытия гибридомной технологии [7]. Преимуществом мАТ является их высокая специфичность и высокая аффинность по отношению к молекулярной мишени (антигену), а также технологическая доступность и хорошо отработанные возможности модификации, в том числе, с применением технологий генной инженерии.

В клиническом применении радиоиммунотерапия (РИТ) сегодня представлена единственным препаратом, предназначенным для лечения определенных видов лимфопролиферативных заболеваний (^{90}Y-ibritumomab tiuxetan, Zevalin®). Результаты множества клинических исследований радиомеченных антител к антигенам солидных опухолей, проведенных за последние три десятилетия, оцениваются как достаточно скромные, не показавшие ожидаемых терапевтических эффектов [7, 16].

Неудачи РИТ с использованием полноразмерных антител при солидных опухолях связывают с несколькими причинами [7, 8]. Во-первых, полноразмерные антитела потенциально иммуногенны, что приводит к образованию нейтрализующих их антител и иммунных комплексов. Во-вторых, благодаря относительно большой молекулярной массе (~ 150 кДа) и взаимодействию Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулинов с рецепторами на клетках крови и клетках эндотелия, полноразмерные антитела длительно удерживаются в циркуляции и недостаточно эффективно проникают за пределы эндотелиального барьера в опухолевую ткань. Как результат, доза радиоактивного излучения, достигающего опухоль, оказывается недостаточной для того, чтобы вызвать необратимые повреждения клеток.

Использование химерных и гуманизированных антител, большая часть молекулы которых идентична иммуноглобулинам человека, а также полностью человеческих мАТ (рис.1), позволяет частично или полностью устранить фактор иммуногенности вектора. В настоящее время, по сведениям ресурса ClinicalTrials.gov [17], начаты клинические испытания нескольких средств, разработанных на основе таких рекомбинантных продуктов: меченного иттрием-90 химерного мАТ к раково-эмбриональному антигену (NCT00738452), несущих лютеций-177 гуманизированных мАТ к CA19-9 (NCT02300922, NCT0311834) и простат-специфическому мембранному антигену (ПСМА; NCT00195039, NCT03545165 и др.).

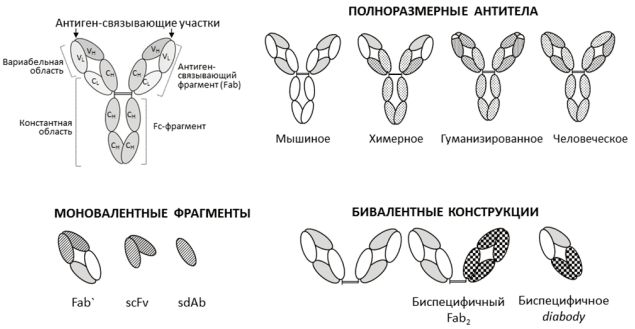

Рис. 1. Примеры рекомбинантных антител и их производных. Химерное антитело – вариабельные антиген-узнающие фрагменты моноклонального антитела мыши (V_L-V_H) объединены с константной областью IgG человека; гуманизированное антитело – в структуру IgG человека включены минимальные специфические участки V_L-V_H; человеческое антитело – получено рекомбинаций человеческих видовых участков IgG; Fab´ – антиген-связывающий моновалентный фрагмент IgG; scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент; sdAb - однодоменное антитело; биспецифичные Fab_2 – в единую конструкцию объединены Fab´-фрагменты двух антител, узнающих разные антигены; биспецифичное diabody – конструкция из двух V_L-V_H антител разной специфичности

Fig. 1. Examples of recombinant antibodies and their derivatives. Chimeric antibody – variable antigen-recognizing fragments of mouse monoclonal antibody (VL-VH) are combined with the constant region of human IgG; humanized antibody – minimal specific sites of VL-VH are included in the structure of human IgG; human antibody – recombinations of human specific sites of IgG are obtained; Fab´ – antigen-binding monovalent fragment of IgG; scFv – single-stranded variable fragment; sdAb – single-domain antibody ; bispecific Fab_2 – Fab´ fragments of two antibodies recognizing different antigens are combined into a single structure; bispecific diabody is a construction of two VL-VH antibodies of different specificity

[1]DOTA – 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота; NOTA – 1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусная кислота; TETA – 1,4,8,11– тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота; DTPA – диэтилентриаминпентауксусная кислота.

Технологии получения рекомбинантных производных антител делают возможным создание структурных модификаций, содержащих только ту часть молекулы иммуноглобулина, которая отвечает за специфическое связывание с антигеном. – Fab_2- фрагментов, одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), однодоменных антител (sdAb) и др. (рис.1) [8]. По сравнению с полноразмерными антителами, малые фрагменты легко диффундируют в ткани, не вступают в неспецифические взаимодействия, но слишком быстро выводятся из циркулирующего кровотока, поэтому, как правило, их используют для функционализации наночастиц и полимерных носителей. Увеличение прочности удержания таких молекул в ткани и обеспечение оптимальных фармакокинетических свойств достигается созданием поливалентных производных. Сочетание в одной рекомбинантной конструкции элементов, узнающих разные антигены, позволяет создавать би- и триспецифичные носители [18]. Многообещающим походом в использовании таких многофункциональных конструкций является технология так называемого «предварительного нацеливания» радионуклида (Pretargeted RadioImmunoTherapy, PRIT) [19].

В самом общем виде PRIT предполагает разделение во времени введения в организм антител и радиомеченного лиганда, при этом образование радиоиммуноконъюгата происходит уже *in vivo*. Согласно этой стратегии, на первом этапе вводят бифункциональные антитела (или их производные), способные взаимодействовать, с одной стороны, с антигеном опухолевых клеток, с другой стороны – с радиолигандом. После распределения антител в организме и «осветления» кровотока, вводят радиолиганд, который связывается с векторной молекулой непосредственно в опухоли. При этом несвязавшийся радиолиганд, благодаря малому размеру, быстро выводится из кровотока и нормальных тканей.

Для создания двойной функциональности антител предлагаются различные подходы [20]. Первый подход заключается в использовании рекомбинантных биспецифических антител, в которых один вариабельный фрагмент взаимодействует с антигеном на опухолевых клетках, а другой – с гаптеном, меченным радионуклидом. Гаптеном может служить короткий пептид HSG (гистамин-сукцинил-глицин) или производное хелатирующего соединения (например, DOTA). При этом современные генно-инженерные технологии дают возможность получения самых разнообразных вариантов таких биспецифических конструкций [20].

Во втором подходе для мечения антител и связывания радионуклида используется пара соединений, образующих между собой высокоаффинную связь. Такой парой могут служить стрептавидин и биотин, комплементарные олигонуклеотиды (морфолино-олигомеры и пептидные рибонуклеиновые кислоты). Однако самым перспективным направлением на сегодняшний день считается использование соединений, способных вступать в биоортогональные химические реакции, как например – транс-циклооктен (TCO) и тетразин [21].

В результате высокого сродства компонентов друг к другу применение стратегии PRIT позволяет существенно повысить избирательность накопления радионуклида в опухолевой ткани, что увеличивает качество визуализации очагов поражения, а также селективность радиационного воздействия [22]. Для укорочения продолжительности периода «осветления» кровотока и повышения эффективности связывания радиолиганда с мишенью, между введением антител и радиолиганда предлагается дополнительное введение вещества, которое связывает циркулирующие антитела, например, декстрана [23]. Исследуются преимущества применения PRIT для тераностики [22, 23].

Стратегия PRIT успешно апробирована как инструмент визуализации опухолевых очагов в клинических исследованиях [24]. Инициированы клинические испытания композиции, состоящей из биспецифичного тривалентного антитела TF2 и меченного лютецием-177 гаптена IMP288, у больных раком легкого (NCT 01221675) [17]. Пояснения к составу данной композиции представлены в виде схемы на рис. 2.

Аналоги антител. Возможность преодолеть недостатки существующих вариантов радиоиммунотерапии связывают с использованием в качестве носителей радионуклидов альтернативных каркасных белков (АКБ) [25]. АКБ представляют собой рекомбинантные полипептидные аналоги антител (nanobody, DARPin, affibody*)*, в состав которых входят последовательности, идентичные высокоспецифичным антиген-связывающим участкам антител. Молекулярный вес nanobody и DARPin составляет около 15 кДа, affibody – около 6 кДа. АКБ низкоиммуногенны, небольшой размер облегчает проникновение таких молекул за пределы кровеносных сосудов, но ускоряет их выведение почками и увеличивает вероятность неспецифического их накопления в тканях. Модификации структуры АКБ, полученные путем их генно-инженерного слияния с фрагментами иммуноглобулинов, альбумином плазмы крови или путем конъюгирования с полиэтиленгликолем, позволяют оптимизировать фармакокинетические свойства конструкций и способствуют их стабильности в кровотоке. Возможность использования АКБ в качестве вектора для диагностических и терапевтических радионуклидов

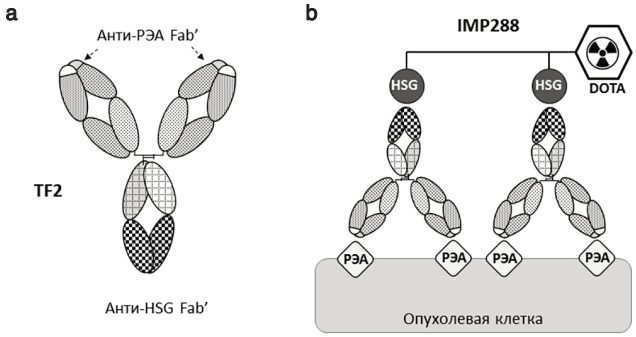

Рис. 2. Схематическое изображение компонентов для предварительного нацеливания радиомеченного лиганда (PRIT, pretargeted radioimmunotherapy) на примере композиции [Анти-РЭА / Анти-HSG TF2] и IMP288 [24, 39].
a – Структура TF2 (Tri-Fab′): рекомбинантная биспецифичная тривалентная конструкция, состоящая из двух Fab′-фрагментов, узнающих раково-эмбриональный антиген (РЭА), и Fab′-фрагмента, взаимодействующего с пептидным гаптеном HSG (гистамин – сукцинил – глицин). b – IMP288 – синтетический пептид, представляющий собой два HSG, соединенные аминокислотным мостиком, конъюгированный с хелатором DOTA. Представлен предполагаемый механизм взаимодействия комплекса: TF2 взаимодействует с РЭА на поверхности опухолевой клетки; HSG-специфичный участок конструкции связывает бивалентный пептид-гаптен IMP288, несущий радионуклид

Fig. 2. Schematic representation of components for preliminary targeting of a radiolabeled ligand (PRIT, pretargeted radioimmunotherapy) on the example of the composition [Anti-REA / Anti-HSG TF2] and IMP288 [24, 39].
a – TF2 (Tri-Fab′) structure: a recombinant bispecific trivalent construct consisting of two Fab′ fragments recognizing cancer-embryonic antigen (REA) and a Fab′ fragment interacting with the HSG peptide hapten (histamine-succinyl-glycine). b – IMP288 is a synthetic peptide consisting of two HSGS connected by an amino acid bridge, conjugated with a DOTA chelator. The proposed mechanism of interaction of the complex is presented: TF2 interacts with REA on the surface of a tumor cell; An HSG-specific section of the structure binds a bivalent peptide, the IMP288 hapten, carrying a radionuclide

показана в ряде экспериментальных разработок, выполненных *in vitro* и на моделях ксенографтов опухоли человека, например, с использованием конструкций, взаимодействующих с молекулой HER2/neu [26] или рецептором фактора роста эндотелия сосудов VEGFR2 [27].

Пептиды. Пептидные лиганды клеточных рецепторов, благодаря своим небольшим размерам (от 1 до 15 кДа), хорошо проникают в ткани, обладают низкой иммуногенностью и технологичны. Недостатки пептидов — быстрая фармакокинетика, уязвимость для протеолитических ферментов и низкая аффинность как и для аналогов антител – могут быть преодолены их структурной модификацией [28].

Применение меченных радионуклидами пептидов – аналогов гормона соматостатина (^{90}Y-DOTATOC, ^{177}Lu-DOTATATE), показывает впечатляющие результаты лечения при метастатических и неоперабельных нейроэндокринных злокачественных опухолях, характеризующихся высокой экспрессией рецепторов соматостатина (SSTR2 и SSTR5) [29]. В качестве векторов, которые позволяют существенно улучшить результаты радиотерапевтического воздействия, сегодня рассматривают и антагонисты рецептора соматостатина (BASS, JR11) [30]. На первой фазе клинических испытаний в настоящее время находятся меченные лютецием-177 другие биологически активные лиганды – аналоги минигастрина (агонист CCKR2) и бомбезина (агонист GRPK) (NCT 03872778, NCT 02088645, NCT 03647657) [17]. Заслуживает внимания меченный α-эмиттером висмутом-213 нейропептид (^{213}Bi-DOTA-SP), лиганд рецептора нейрокинина, который экспрессируется на клетках глиальных опухолей. В клиническом исследовании показано, что местное (внутриполостное или внутриопухолевое) введение ^{213}Bi-DOTA-SP позволяет достичь достоверного увеличения продолжительности жизни у больных с рецидивом глиобластомы после стандартного комбинированного лечения [31].

Малые молекулы. К категории малых молекул (small molecules) относят обширную группу биологически активных природных или синтетических соединений, молекулярная масса которых не превышает 900 Да. Этой категории соответствуют некоторые пептидные и стероидные гормоны, нейротрансмиттеры, вторичные метаболиты и фармакологические субстанции, которые в форме агонистов или антагонистов участвуют в различных метаболических процессах [32]. Благодаря малым размерам и естественным механизмам захвата малые молекулы при системном введении легко проникают в ткань опухоли и в опухолевые клетки. Они технологичны и, как правило, подвержены модификации, однако недостатком большинства малых молекул является низкая специфичность их накопления в опухоли. Одним из примеров клинического применения малых молекул в качестве вектора является ^{131}I-MIBG, который используется для лечения нейроэндокринных опухолей и феохромоцитомы [1].

Огромный интерес в настоящее время привлечен к РФП на основе субстрат-подобных лигандов ПСМА [33]. Меченные диагностическими радионуклидами (^{68}Ga или ^{18}F) векторы PSMA-11 и PSMA-617 находят широкое применение в диагностических исследованиях у больных распространенным раком предстательной железы, а в сочетании с ^{177}Lu-PSMA-617 являются примером успешной клинической реализации концепции тераностики [34]. Высокая терапевтическая эффективность ^{177}Lu-PSMA-617 при метастатическом кастрационно-резистентном раке предстательной железы, подтвержденная в многоцентровых клинических испытаниях, стали толчком к разработке новых структурных модификаций лигандов ПСМА, в том числе с увеличенным временем циркуляции радиоконъюгата в кровотоке за счет повышенного сродства носителя к альбумину плазмы крови [35].

Продукты нанотехнологий. Бурное развитие нанотехнологий закономерно привело к появлению идеи использования наноразмерных носителей для доставки радионуклидов. Уникальные химические и физические свойства наноматериалов, такие как большая площадь поверхности и высокий потенциал модификации, делают возможным создание стабильных и биосовместимых носителей, тропных к определенным органам и, возможно, к определенным типам клеток. Считается, что EPR-эффект, а также увеличенный период обращения наноразмерных частиц в кровотоке создают предпосылки для их накопления в опухолевой ткани [36]. В экспериментальных исследованиях представлено множество разработок метода РНТ на основе наноразмерных носителей для местного и системного введения с улучшенными свойствами биораспределения. Изучается возможность использования функционализированных металлосодержащих, углеродных и полимерных наночастиц, дендримеров и липосом, нагруженных диагностическими радионуклидами и эмиттерами терапевтического излучения [8, 36]. Проблемы, возникающие при системном введении наночастиц, технологическая трудоемкость получения таких препаратов, недостаточно изученное взаимодействие материала носителей с клетками и тканями организма, в том числе, их потенциальная токсичность, на сегодняшний день все еще ограничивают возможности применения продуктов нанотехнологий для целей противоопухолевой ТРНТ [19].

4. Субклеточное нацеливание радиоконъюгатов

Одним из вариантов увеличения поглощенной дозы излучения в опухоли и селективности поражающего воздействия является максимальное использование терапевтического потенциала α-эмиттеров и эмиттеров электронов Оже. Плотно ионизированные треки, которые образуют α-частицы и электроны Оже, с высокой вероятностью способны привести к критическому повреждению и гибели клетки, однако короткий пробег этих частиц в биологической ткани требует использования носителей, способных донести источник излучения в непосредственную близость к наиболее уязвимым внутриклеточным структурам.

Критической внутриклеточной мишенью считается ядерный компартмент и собственно ядерная ДНК [37]. Известно, что способностью проникать в клеточное ядро обладают радиомеченные галоген-замещенные дезоксиуридины, витальные красители (акридиновый оранжевый, Hoechst 33342, DAPI), цитостатики – интеркаляторы ДНК (доксорубицин, даунорубицин), аналоги стероидных гормонов. Однако заведомо низкая специфичность накопления в опухоли этих соединений снижает их ценность как векторов для целей ТРНТ.

Особым направлением являются попытки создания радиолигандов, которые в составе лиганд-рецепторных интернализуемых комплексов могут достигать клеточного ядра по механизмам естественного внутриклеточного транспорта. Первые РФП, для которых в свое время был обоснован механизм внутриклеточного ядерного нацеливания источников электронов Оже, такие как ^{111}In-DTPA-октреотид и ^{111}In-DTPA-hEGF (меченный индием-111 рекомбинантный эпидермальный фактор роста), в клинических исследованиях оказались малоэффективными [38]. В последующем, для решения этой задачи предлагались более сложные конструкции, разработан-

ные по принципу «двойного» или «тройного» молекулярного нацеливания (dual- или triple targeting strategy), путем сочетания в составе векторных молекул различных функциональных компонентов [12] или введения в структуру вектора пептидов, работающих как сигналы ядерной локализации (nuclear localization sequence, NLS) [12, 39]. Современным развитием этой концепции являются рекомбинантные модульные нанотранспортеры (МНТ), которые включают в себя комплекс последовательностей, отвечающих за специфическое взаимодействие с мишенью на опухолевой клетке, интернализацию радиоконъюгата и дальнейшее его продвижение по путям внутриклеточного транспорта к клеточному ядру [13, 40, 41]. Преимуществом модульной организации такого вектора является технологическая возможность создания конструкций с заданным спектром целевого действия [42].

Дозиметрия при ТРНТ

Радиобиологические события и закономерности, хорошо описанные для воздействия внешних источников излучения, лишь частично могут быть экстраполированы на область применения ТРНТ. Сложность дозиметрической оценки обусловлена смешанным излучением большинства терапевтических радионуклидов, образованием активных дочерних продуктов при распаде некоторых нуклидных источников, а также динамической неоднородностью распределения активности в опухолевой и нормальной ткани [43]. При этом, по-видимому, необходимо учитывать не только геометрию органа и опухоли-мишени, но и субклеточное распределение активности в различных по радиочувствительности клеточных компартментах, а также возможный вклад нецелевых эффектов, обусловленных биологическими реакциями, которые могут быть индуцированы радиационным поражением [40].

На сегодняшний день возможность точного прогнозирования зависимости доза–эффект в рамках ТРНТ еще остается предметом дискуссий [43]. Для обеспечения объективного дозиметрического планирования и контроля в клинических и в экспериментальных исследованиях активно совершенствуются методы количественной визуализации на основе однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, позитронно-эмиссионной томографии, технологии регистрации тормозного изучения и использования цифровых компьютерных фантомов [43]. Ожидается, что разработка надежных подходов для оценки поглощенных и эффективных доз излучения для различных видов противоопухолевой ТРНТ станет фактором, повышающим терапевтический эффект нацеливания РФП.

Заключение

Таким образом, ядерная медицина как область применения радионуклидных фармацевтических препаратов активно воспринимает в себя современные достижения медико-биологических наук и технологий. Накопленный опыт экспериментальных и клинических исследований открывает новые перспективы в области создания РФП, предназначенных как для диагностических, так и для терапевтических целей. Сегодня между этими двумя направлениями четкой границы практически не существует, о чем свидетельствует их объединение в рамках понятия тераностики. При этом наиболее насущной потребностью является разработка максимально таргетных по отношении к опухоли агентов. Очевидно, что возникающие на этом пути проблемы и задачи носят комплексный характер, и их решение требует консолидированных усилий всех специалистов, занятых в области ядерной медицины. Есть все основания надеяться, что реализация этих усилий приведет к появлению новых эффективных РФП, которые позволят преодолеть ограничения и недостатки существующих методов РНТ, а их применение значительно улучшит результаты лечения больных злокачественными новообразованиями.

Current Trends in Targeted Radionuclide Therapy Development

M.S. Vorontsova, T.A. Karmakova, A.A. Pankratov, A.D. Kaprin

P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute. Moscow, Russia

Contact person: Tatyana Anatolyevna Karmakova, e-mail: kalmar123@yandex.ru

CONTENT

Introduction
1. Features of Targeted Delivery of Therapeutic Radionuclides
2. Design of Pharmaceuticals for Targeted Radionuclide Therapy (TRT)
    2.1. Radionuclides
    2.2. Synthesis of Radioconjugates
    2.3. Targeting Carriers
4. Subcellular Targeting of Radionuclides
5. TRT Dosimetry
Conclusion

Key words: *cancer, solid tumors, targeted radionuclide therapy*

For citation: Vorontsova MS, Karmakova TA, Pankratov AA, Kaprin AD. Current Trends in Targeted Radionuclide Therapy Development. Medical Radiology and Radiation Safety. 2021;66(6):63–70.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-6-63-70

Авторы выражают благодарность специалистам МРНЦ им. А. Ф. Цыба, филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России – заведующему отделением радиохирургического лечения открытыми нуклидами, д.м.н. Крылову Валерию Васильевичу и ведущему научному сотруднику лаборатории экспериментальной ядерной медицины, д.б.н. Петриеву Василию Михайловичу за высокопрофессиональные рекомендации в процессе подготовки материала обзора.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Krylov VV, Kochetova TYu, Garbuzov PI, Shurinov AYu, Borodavina EV. Radionuclide Therapy. Therapeutic Radiology. National Guide. Ed. Caprin A.D., Mardynsky Yu.S. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2019. P. 637-664. (In Russ.). [Крылов В.В., Кочетова Т.Ю., Гарбузов П.И., Шуринов А.Ю., Бородавина Е.В. Радионуклидная терапия // Терапевтическая радиология. Национальное руководство / Под ред. акад. РАН Каприна А.Д., чл.-корр. РАН Мардынского Ю.С. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 637-664.].
2. Chernov VI, Medvedev AA, Sinilkin IG, Zelchan RV, Bragina OD, Choynzonov EL. Nuclear Medicine as a Tool for Diagnosis and Targeted Cancer Therapy. Bulletin of Siberian Medicine. 2018;17;1:220–231. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-220–231 (In Russ.). [Чернов В.И., Медведева А.А., Синилкин И.Г., Зельчан Р.В., Брагина О.Д., Чойзонов Е.Л. Ядерная медицина в диагностике и адресной терапии злокачественных новообразований // Бюллетень сибирской медицины. 2018. Т.17, № 1. С. 220-231. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-220–231].
3. Krylov VV, Kochetova TY, Belozerova MS, Voloznev LV. Features of the Use of Various Radiopharmaceuticals for the Treatment of Patients with Bone Metastases. Palliative Medicine and Rehabilitation. 2015;4:26-33. (In Russ.). [Крылов В.В., Кочетова Т.Ю., Белозерова М.С., Волознев Л.В. Особенности применения различных радиофармпрепаратов в лечении больных с метастазами в кости // Паллиативная медицина и реабилитация. 2015. № 4. С. 26-33].
4. Pattni BS, Torchilin VP. Targeted Drug Delivery Systems: Strategies and Challenges. Targeted Drug Delivery: Concepts and Design. Advances in Delivery Science and Technology. Ed. Devarajan P., Jain S. Springer, Cham, 2015. P. 1-38.
5. Bae YH, Park K. Targeted Drug Delivery to Tumors: Myths, Reality and Possibility. J. Control Release. 2011;153;3:198-205. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.06.001.
6. Keefe DMK, Bateman EH. Potential Successes and Challenges of Targeted Cancer Therapies. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 2019;2019;53:lgz008. DOI: 10.1093/jncimonographs/lgz008.
7. Larson SM, Carrasquillo JA, Cheung NK, Press OW. Radioimmunotherapy of Human Tumours. Nat. Rev. Cancer. 2015;15;6:347-60. DOI: 10.1038/nrc3925.
8. Peltek OO, Muslimov AR, Zyuzin MV, Timin AS. Current Outlook on Radionuclide Delivery Systems: from Design Consideration to Translation into Clinics. J. Nanobiotechnology. 2019;17;1:90. DOI: 10.1186/s12951-019-0524-9.
9. Chernov VI, Bragina OD, Sinilkin IG, Medvedeva AA, Zel'chan RV. Radionuclide Theranostics of Malignancies. Russian Journal of Radiology. 2016;97;5:306-313. DOI: 10.20862/0042-4676-2016-97-5-306-313. (In Russ.). [Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радионуклидная тераностика злокачественных образований // Вестник рентгенологии и радиологии. 2016. Т.9, № 5. С. 306–313. DOI: 10.20862/0042-4676-2016-97-5-306-313.].
10. Makvandi M, Dupis E, Engle JW, Nortier FM, Fassbender ME, et al. Alpha-Emitters and Targeted Alpha Therapy in Oncology: from Basic Science to Clinical Investigations. Target Oncol. 2018;13;2:189-203. DOI: 10.1007/s11523-018-0550-9.
11. Ku A, Facca VJ, Cai Z, Reilly RM. Auger Electrons for Cancer Therapy - a Review. EJNMMI Radiopharm Chem. 2019;4;1:27. DOI: 10.1186/s41181-019-0075-2.
12. Bavelaar BM, Lee BQ, Gill MR, Falzone N, Vallis KA. Subcellular Targeting of Theranostic Radionuclides. Front. Pharmacol. 2018;9:996. DOI: 10.3389/fphar.2018.00996.
13. Rosenkranz AA, Slastnikova TA, Georgiev GP, Zalutsky MR, Sobolev AS. Delivery Systems Exploiting Natural Cell Transport Processes of Macromolecules for Intracellular Targeting of Auger Electron Emitters. Nucl. Med. Biol. 2020;80;1:45-56. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2019.11.005.
14. Edem PE, Fonslet J, Kjær A, Herth M, Severin G. In Vivo Radionuclide Generators for Diagnostics and Therapy. Bioinorg. Chem. Appl. 2016;2016:6148357. DOI: 10.1155/2016/6148357.
15. Price EW, Orvig C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. Chem Soc Rev. 2014;43;1:260-90. DOI: 10.1039/c3cs60304k.
16. Chernov VI, Bragina OD, Sinilkin IG, Titskaya AA, Zelchan RV. Radioimmunotherapy in the Treatment of Malignancies. Siberian Journal of Oncology. 2016;15;2:101–106. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-2-101-106. (In Russ.). [Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Тицкая А.А., Зельчан Р.В. Радиоиммунотерапия в лечении злокачественных образований // Сиб. Онкол. Жур. 2016. Т.15, № 2. С. 101-106. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-2-101-106].
17. ClinicalTrials.gov: Database of privately and publicly funded clinical studies conducted around the world. U.S. National Library of Medicine. Available from: https://clinicaltrials.gov. 2019 Oct 07.
18. Yu S, Li A, Liu Q, Yuan X, Xu H, Jiao D, et al. Recent Advances of Bispecific Antibodies in Solid Tumors. J. Hematol. Oncol. 2017;10;1:155. DOI: 10.1186/s13045-017-0522-z.
19. Rosenblum D, Joshi N, Tao W, Karp JM, Peer D. Progress and Challenges Towards Targeted Delivery of Cancer Therapeutics. Nat. Commun. 2018;9;1:1410. DOI: 10.1038/s41467-018-03705-y.
20. Altai M, Membreno R, Cook B, Tolmachev V, Zeglis BM. Pretargeted Imaging and Therapy. J. Nucl. Med. 2017;58;10:1553-1559. DOI: 10.2967/jnumed.117.189944.
21. Shen G, Liu Z, Bao Y, Kuang A, Wu H From Darkness to Light: Pretargeted Radionuclide Imaging Driven by Tetrazine Bioorthogonal Chemistry. Curr. Top. Med. Chem. 2018;18;21:1851-1855. DOI: 10.2174/1568026618211901041200031.
22. Stéen EJL, Edem PE, Nørregaard K, Jørgensen JT, Shalgunov V, Kjaer A, et al. Pretargeting in Nuclear Imaging and Radionuclide Therapy: Improving Efficacy of Theranostics and Nanomedicines. Biomaterials. 2018;179:209-245. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.021.
23. Cheal SM, Xu H, Guo HF, Patel M, Punzalan B, Fung EK, et al. Theranostic Pretargeted Radioimmunotherapy of Internalizing Solid Tumor Antigens in Human Tumor Xenografts in Mice: Curative Treatment of HER2-Positive Breast Carcinoma. Theranostics. 2018;8;18:5106-5125. DOI: 10.7150/thno.26585.
24. Bodet-Milin C, Bailly C, Touchefeu Y, Frampas E, Bourgeois M, Rauscher A, et al. Clinical Results in Medullary Thyroid Carcinoma Suggest High Potential of Pretargeted Immuno-PET for Tumor Imaging and Theranostic Approaches. Front. Med. (Lausanne). 2019;6:124. DOI: 10.3389/fmed.2019.00124.
25. Richards DA. Exploring Alternative Antibody Scaffolds: Antibody Fragments and Antibody Mimics for Targeted Drug Delivery. Drug. Discov. Today Technol. 2018;30:35-46. DOI: 10.1016/j.ddtec.2018.10.005.
26. Bragina OD, Larkina MS, Stasyuk ES, Chernov VI, Yusubov MS, 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. Russian. DOI 10.20538/1682-0363-2017-3-25–33. (In Russ.). [Брагина О.Д., Ларькина М.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Юсубов М.С. и др. Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченых 99mTc рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu // Бюллетень сибирской медицины. 2017. Т.16, № 3. С. 25–33. DOI 10.20538/1682-0363-2017-3-25–33].
27. Mitran B, Güler R, Roche FP, Lindström E, Selvaraju RK, Fleetwood F, et al. Radionuclideimaging of VEGFR2 in Glioma Vasculature Using Biparatopic Affibody Conjugate:Proof-of-Principle in a Murine Model. Theranostics. 2018;8;16:4462-4476.DOI: 10.7150/thno.24395.
28. Soudy R, Byeon N, Raghuwanshi Y, Ahmed S, Lavasanifar A, Kaur K. Engineered Peptides for Applications in Cancer-Targeted Drug Delivery and Tumor Detection. Mini. Rev. Med. Chem. 2017;17;18:1696-1712. DOI: 10.2174/1389557516666160219121836.
29. Cives M, Strosberg J. Radionuclide Therapy for Neuroendocrine Tumors. Curr. Oncol. Rep. 2017;19;2:9. DOI: 10.1007/s11912-017-0567-8.
30. Fani M, Nicolas GP, Wild D. Somatostatin Receptor Antagonists for Imaging and Therapy. J. Nucl. Med. 2017;58:61S-66S. DOI: 10.2967/jnumed.116.186783.
31. Królicki L, Bruchertseifer F, Kunikowska J, Koziara H, Królicki B,

Jakuciński M, et al. Safety and Efficacy of Targeted Alpha Therapy with 213Bi-DOTA-Substance P in Recurrent Glioblastoma. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2019;46;3:614-622. DOI: 10.1007/s00259-018-4225-7.
32. Kue CS, Kamkaew A, Burgess K, Kiew LV, Chung LY, Lee HB. Small Molecules for Active Targeting in Cancer. Med. Res. Rev. 2016;36;3:494-575. DOI: 10.1002/med.21387.
33. Sun M, Niaz MO, Nelson A, Skafida M, Niaz MJ. Review of 177Lu-PSMA-617 in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. Cureus. 2020;12;6:e8921. DOI: 10.7759/cureus.8921.
34. Violet J, Sandhu S, Iravani A, Ferdinandus J. Thang S.P., Kong G., et al. Long-Term Follow-up and Outcomes of Retreatment in an Expanded 50-Patient Single-Center Phase II Prospective Trial of 177Lu-PSMA-617 Theranostics in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. J. Nucl. Med. 2020;61;6:857-865. DOI: 10.2967/jnumed.119.236414.
35. Umbricht CA, Benešová M, Schibli R, Müller C. Preclinical Development of Novel PSMA-Targeting Radioligands: Modulation of Albumin-Binding Properties to Improve Prostate Cancer Therapy. Mol Pharm. 2018;15;6:2297-2306. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00152.
36. Mi Y, Shao Z, Vang J, Kaidar-Person O, Wang AZ. Application of Nanotechnology to Cancer Radiotherapy. Cancer Nanotechnol. 2016;7;1:11. DOI: 10.1186/s12645-016-0024-7.
37. Pouget JP, Lozza C, Deshayes E, Boudousq V, Navarro-Teulon I. Introduction to Radiobiology of Targeted Radionuclide Therapy. Front. Med. (Lausanne). 2015;2:12. DOI: 10.3389/fmed.2015.00012.
38. Vallis KA, Reilly RM, Scollard D, Merante P, Brade A, Velauthapillai S, et al. Phase I Trial to Evaluate the Tumor and Normal Tissue Uptake, Radiation Dosimetry and Safety of (111)In-DTPA-Human Epidermal Growth Factor in Patients with Metastatic EGFR-Positive Breast Cancer. Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2014;4;2:181-92.
39. Violet JA, Farrugia G, Skene C, White J, Lobachevsky P, Martin R. Triple Targeting of Auger Emitters Using Octreotate Conjugated to a DNA-Binding Ligand and a Nuclear Localizing Signal. Int. J. Radiat. Biol. 2016;92;11:707-715.
40. Sobolev AS. Modular Nanotransporters for Nuclear-Targeted Delivery of Auger Electron Emitters. Front. Pharmacol. 2018;9:952. DOI: 10.3389/fphar.2018.00952.
41. Rosenkranz AA, Slastnikova TA, Durymanov MO, Georgiev GP, Sobolev AS. Exploiting Active Nuclear Import for Efficient Delivery of Auger Electron Emitters into the Cell Nucleus. Int. J. Radiat. Biol. 2020:1-11. DOI: 10.1080/09553002.2020.1815889.
42. Sobolev AS. The Delivery of Biologically Active Agents into the Nuclei of Target Cells for the Purposes of Translational Medicine. Acta Naturae. 2020;12;4:47-56. DOI: 10.32607/actanaturae.11049.
43. Li T, Ao ECI, Lambert B, Brans B, Vandenberghe S, Mok GSP. Quantitative Imaging for Targeted Radionuclide Therapy Dosimetry - Technical Review. Theranostics. 2017;7;18:4551-4565. DOI: 10.7150/thno.19782.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.
Поступила: 23.12.2020. Принята к публикации: 20.01.2021.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Financing. The study had no sponsorship.
Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.
Article received: 23.12.2020. Accepted for publication: 20.01.2021.