DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-127-134

К.О. Авров[1], С.В. Шатик[1], О.А. Шашкова[1], А.А. Пиневич[1], Л.А. Терехина[1], И.В. Грязева[1], В.В. Зайцев[1], А.А. Станжевский[1], М.П. Самойлович[1, 2]

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА И СПОСОБА ВВЕДЕНИЯ РАДИОКОНЪЮГАТОВ, СОЗДАННЫХ НА ОСНОВЕ НАНОАНТИТЕЛ, НА НАКОПЛЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ В ПОЧКАХ МЫШЕЙ

[1] Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. академика А.М. Гранова Минздрава России, Санкт-Петербург

[2] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Контактное лицо: Кирилл Олегович Авров, e-mail: i@kiav67.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Исследовать уровень накопления в почках мышей радиоконьюгатов, созданных на основе наноантител, в зависимости от состава и способа введения.
Материал и методы: Для получения радиоконъюгатов использовали наноантитела, специфичные к биомаркерам человека: PD-L1, HER2/neu, VEGFR2 и хелатирующие агенты p-SCN-Bn_DOTA (DOTA) или этилскваратное производное дефероксамина (DFO). Эксперименты проводили на мышах F1(DBA/2×BALB/c). В ретроорбитальный венозный синус, хвостовую вену или под кожу животных вводили по 100 мкл раствора радиоконъюгата. Через 4 или 24 ч после введения антител, конъюгированных с радионуклидом ^{177}Lu, и через 0,5, 1, 1,5 или 2 ч после введения меченных радионуклидом ^{68}Ga антител проводили исследование биораспределения радиоконъюгатов в организме экспериментальных животных методом прямой радиометрии органов и тканей.
Результаты: Обнаружено, что после введения в кровоток радиоконъюгаты, содержащие одинаковые радионуклиды и хелаторы, но изготовленные на основе разных наноантител, различно накапливаются в почках мышей. Так, установлено, что через 30 мин после введения [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu накопление радиоактивности в почках было в 2 раза меньше, чем после введения [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1. Через 24 ч после введения [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 этот показатель был в 2 раза меньше, чем после введения (^{177}Lu)Lu-VHH PD-L1. Для этих пар радиоконъюгатов радиоактивность мочи была также меньше после введения [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu или [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2. Замена DFO на DOTA в качестве хелатной группы [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu значительно снижала радиоактивность почек через 1 и 2 ч после введения радиоконъюгата. Также было показано, что накопление радиоактивности в почках зависит от способа введения радиоконъюгатов. Через 4 ч после подкожного ведения [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 относительная радиоактивность почек была в 3 раза меньше, чем после введения радиоконъюгата в хвостовую вену, в то время как через 1 ч после введения [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 различия были двукратными. Биораспределение [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 в других органах и тканях после введения в хвостовую вену, ретроорбитальный синус или подкожно было одинаковым. Показано, что через 1 мин после подкожного введения [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 в кровоток попадает гораздо меньше радиоконъюгата, чем после его введения в хвостовую вену. На основании полученных данных выдвинуто предположение, что накопление радиоактивности в почках может быть уменьшено путём увеличения продолжительности введения радиоконъюгата в кровоток.
Заключение: Показано, что накопление радиоконъюгатов в почках зависит от наноантител и хелатирующих групп, использованных при их синтезе, а также от способа введения радиоконъюгатов. Полученные данные открывают новые пути снижения радиационной нагрузки на почки при таргетной терапии или диагностике

Ключевые слова: *радиоконъюгаты, радионуклиды, наноантитела, хелаторы, почки, кровоток, мыши*

Для цитирования: Авров К.О., Шатик С.В., Шашкова О.А., Пиневич А.А., Терехина Л.А., Грязева И.В., Зайцев В.В., Станжевский А.А., Самойлович М.П. Влияние состава и способа введения радиоконъюгатов, созданных на основе наноантител, на накопление радиоактивности в почках мышей // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2026. Т. 71. № 6. С. 127–134. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-127-134

DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-127-134

K.O. Avrov[1], S.V. Shatik[1], O.A. Shashkova[1], A.A. Pinevich[1], L.A. Terekhina[1], I.V. Gryazeva[1], V.V. Zaitsev[1], A.A. Stanzhevskiy[1], M.P. Samoylovich[1, 2]

Effect of the Composition and Route of Administration of Nanobody-Based Radioconjugates on Radioactivity Accumulation in Mouse Kidneys

[1] A.M. Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, St. Peterburg, Russia

[2] Saint Petersburg State University, St. Peterburg, Russia

Contact person: Kirill Olegovich Avrov, e-mail: i@kiav67.ru

ABSTRACT

Purpose: This study investigated the level of accumulation of based on nanoantibodies radioconjugates in the kidneys of mice, depending on the composition and the route of administration.
Material and methods: Radioconjugates were prepared using nanoantibodies specific to the biomarkers PD-L1, HER2/neu, and VEGFR2, along with the chelating agents p-SCN-Bn_DOTA or the ethyl squarate derivative of deferoxamine. Experiments were performed using F1 (DBA/2×BALB/c) mice. 100 μL of the radioconjugate solutions were injected into the retroorbital venous sinus, tail vein, or subcutaneously. A study of the radioconjugate's biodistribution in experimental animals was performed 4 or 24 hours after administration of antibodies

conjugated with ^{177}Lu radionuclide and 0.5, 1, 1.5, or 2 hours after administration of antibodies labeled with the ^{68}Ga radionuclide. Direct organ and tissue dosimetry was used to measure the biodistribution of the radioconjugates.
Results: It was found that radioconjugates containing the same radionuclides and the same chelator (DOTA), but manufactured on the basis of different nanoantibodies, accumulate in the kidneys differently after administration. Thus, it was established that 30 minutes after the administration of [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu, the radioactivity of the kidneys was twice lower than after the administration of [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1. 24 hours after the administration of (^{177}Lu)Lu-VHH VEGFR2, such radioactivity was also twice lower than after the administration of [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1. Moreover, for these pairs of radioconjugates, the radioactivity of the urine was also lower after the administration of [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu or [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2. Replacing DFO with DOTA as the chelating group for [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu significantly reduced kidney radioactivity at 1 and 2 hours after administration of this radioconjugate. Kidney radioactivity was also shown to depend on the route of administration of the radioconjugates. Four hours after subcutaneous administration of [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1, the relative kidney radioactivity was approximately 3 times lower than after administration of the radioconjugate into the tail vein, while 1 hour after administration of [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1, effect of different administration was twofold. Moreover, after [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 administration into the tail vein, its biodistribution in other organs and tissues was the same as after subcutaneous or retroorbital sinus administration. It was shown that 1 minute after subcutaneous administration of (^{68}Ga)Ga-VHH PD-L1, significantly less radioconjugate entered the bloodstream than after its administration into the tail vein. Based on the data obtained, it was suggested that the accumulation of radioactivity in the kidneys could be reduced by increasing the duration of administration of the radioconjugate into the bloodstream.
Conclusion: It was shown that radioconjugate accumulation in the kidneys depends on the nanoantibodies and chelating groups used for their synthesis, as well as on the method of radioconjugate administration. The obtained data open up new ways to reduce radiation exposure to the kidneys during targeted diagnostics or therapy.

Keywords: *radioconjugates, radionuclides, nanoantibodies, chelators, kidneys, bloodflow, mice*

For citation: Avrov KO, Shatik SV, Shashkova OA, Pinevich AA, Terekhina LA, Gryazeva IV, Zaitsev VV, Stanzhevskiy AA, Samoylovich MP. Effect of the Composition and Route of Administration of Nanobody-Based Radioconjugates on Radioactivity Accumulation in Mouse Kidneys. Medical Radiology and Radiation Safety. 2026;71(6):127–134. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-127-134

Введение

Использование таргетных радиофармацевтических препаратов для терапии и диагностики злокачественных новообразований является бурно развивающимся направлением медицины. Такие препараты обладают способностью избирательно связываться с клетками, экспрессирующими молекулы-мишени, что позволяет уменьшить радиационную нагрузку на ткани, в которых нет подобной экспрессии. Радиофармпрепараты являются конъюгатами, содержащими радионуклид, хелатор, если радионуклидом является изотоп металла, и векторную молекулу. Такими молекулами могут быть пептиды и малые молекулы (до 5 кДа), каркасные белки (3–20 кДа), цельные моноклональные антитела (150 кДа), а также фрагменты антител: Fab-фрагменты (50–55 кДа), scFv (28 кДа) и наноантитела (12–15 кДа). Радиоконъюгаты, созданные на основании этих молекул, за исключением моноклональных антител, имеют молекулярную массу менее 70 кДа, и благодаря этому способны проходить через почечный барьер и удаляться из организма с мочой. В результате выведение радиоактивности из крови и других тканей организма после введения таких радиоконъюгатов происходит гораздо быстрее, чем после введения радиоконъюгата с большей молекулярной массой. Так, половина введенных наноантител удаляется из крови в течение 30–60 мин, в то время как для моноклональных антител это время составляет 1–3 недели [1]. Это позволяет уменьшить радиационную нагрузку на организм, а также увеличить контрастность изображения при визуализации опухолей, что необходимо при использовании для диагностики короткоживущих радионуклидов [2, 3]. Однако после введения радиоконъюгатов с молекулярной массой менее 70 кДа происходит накопление радиоактивности в почках, поскольку они не проникают через почечный барьер, особенно это выражено при применении радиоконъюгатов, содержащих изотопы металлов.

Наноантитела или VHH-антитела, имеющие массу 12–15 кДа, являются антигенсвязывающими фрагментами тяжёлоцепочечных антител, которые присутствуют в крови млекопитающих семейства *Camelidae*. Они обладают меньшей иммуногенностью и значительно большей стабильностью, чем целые моноклональные антитела с массой 150 кДа [4]. При этом они могут иметь специфичность практически к любым эпитопам в отличие от низкомолекулярных лигандов, которые специфичны только к ограниченному ряду рецепторов. Поскольку радиоконъюгаты на основе наноантител обладают сравнительно небольшой молекулярной массой, то они, как указывалось, не проникают через почечный барьер, что приводит к высокой радиоактивности почек после их введения в кровоток [3, 4–8]. Радиоактивность почек можно уменьшить введением сопутствующих веществ, таких как лизин, аргинин, гелофузин и других, снижающих реабсорбцию радиоконъюгатов [9, 10]. Кроме того, накопление радиоактивности в почках можно снижать путем присоединения к радиоконъюгату связывающего альбумин домена, остатков полиэтиленгликоля или декстрана, использования расщепляющих линкеров, предварительного нацеливания, изменения хелаторов и линкеров, связывающих их с векторной молекулой [2, 10, 11]. При этом не выяснено, насколько значительное влияние на накопление в почках оказывают индивидуальные особенности белковых векторных молекул, в том числе наноантител.

В настоящей работе нами проведено такое исследование. До настоящего времени практически не изучена зависимость радиоактивности почек от способа введения радиоконъюгата. Сравнительный анализ таких исследований актуален и необходим для понимания закономерностей биораспределения радиофармпрепаратов и возможности снижения радиоактивности в почках после их введения.

Материалы и методы

Наноантитела, аффинные к PD-L1, HER2/neu и VEGFR2 человека

Объектами исследования служили конъюгированные с радионуклидами рекомбинантные однодоменные тяжёлоцепочечные антитела (наноантитела, VHH), распознающие эпитоп PD-L1 человека (VHH PD-L1), HER2/neu человека (VHH HER2/neu) и VEGFR2 человека (VHH VEGFR2), предоставленные ООО ИННОВА Плюс, Россия.

Синтез радиоконъюгатов

Для получения хелатирующих предшественников (ХП) использовали наноантитела, специфичные к био-

маркерам PD-L1, HER2/neu, VEGFR2 и коммерчески доступный хелатирующий агент p-SCN-Bn_DOTA (DOTA, Macrocyclics, США) или самостоятельно полученный хелатирующий агент, являющийся этилскваратным производным дефероксамина (DFO).

Для синтеза радиоконъюгатов, содержащих ^{68}Ga, использовали элюат генератора галлия-68 (производства ЗАО «Циклотрон») в виде раствора хлорида галлия в 0,1 М хлористоводородной кислоте. К 100 мкг ХП, растворенного в 100 мкл 50 мМ аммоний-ацетатного буфера, pH 7,5, добавляли 20 мкл 1М натрий-ацетатного буфера, pH 7,5 и 100 мкл элюата генератора, содержавшего 30–50 МБк ^{68}Ga. Реакционную смесь инкубировали 15 мин на термошейкере TS-100C (Biosan) 1000 об/мин в защитном ламинарном боксе при 60°C, если использовали хелатирующий агент DOTA и при 30°C, если использовали DFO. Удельная активность радиоконъюгата составляла 0,3–0,5 МБк/мкг.

Для получения радиоконъюгатов, содержащих ^{177}Lu, использовали раствор хлорида лютеция, ^{177}Lu, без носителя, в 0,1 М HCl (ГНЦ НИИАР ГК Росатом). 100 мкг К 100 мкг ХП, растворенного в 100 мкл 50 мМ аммоний-ацетатного буфера, pH 7,5, добавляли 20 мкл 1М натрий-ацетатного буфера, pH 7,5 и добавляли 100 мкл раствора [^{177}Lu]$LuCl_3$ (15–45 МБк, 2,5 мкл). Радиомечение лютецием-177 проводили в закрытой пробирке (37°C, 15–20 мин) в присутствии кислорода воздуха при перемешивании в термошейкере (1000 об/мин) в защитном ламинарном боксе.

Полученные радиоконъюгаты анализировали методами радиотонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием пластинок ITLC SG и Agilent и радио-высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), которую выполняли с помощью хроматографа Ultimate 3000 (Dionex) и колонки Superdex 75 Increase, (Cytiva, США). Удельная активность радиоконъюгатов составляла 0,15–0,45 МБк/мкг. Радиохимическая чистота всех радиоконъюгатов была не менее 95%.

Эксперименты на животных

Эксперименты проводили на мышах F1(DBA/2×BALB/c) обоего пола. Мышей содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Исследование динамики биораспределения радиоконъюгатов методом прямой радиометрии

Животных вводили в состояние наркоза (Золетил-100, 30 мг/кг и Ксилавет, 8 мг/кг, внутримышечно), после чего в ретроорбитальный венозный синус или в хвостовую вену вводили по 100 мкл растворов радиоконъюгата. В некоторых опытах препараты вводили в хвостовую вену или подкожно мышам без наркотизации. Объемная активность радиоконъюгатов, содержащих ^{68}Ga, составляла 10–12 МБк/мл, содержащих ^{177}Lu – 8–16 МБк/мл.

Через 4 или 24 ч после введения антител, конъюгированных с радионуклидом ^{177}Lu (время полураспада 6,65 сут), или через 0,5, 1, 1,5 или 2 ч после введения меченных радионуклидом ^{68}Ga (период полураспада 68 мин) антител проводили исследование биораспределения в организме экспериментальных животных. Для этого животных умерщвляли введением избыточной дозы Золетила-100, после чего производили вскрытие и отбирали образцы тканей и биологических жидкостей. Количественное определение активности радионуклидов в образцах проводили с помощью радиометра активности радионуклидов (Triathler, Финляндия), используя для ^{68}Ga энергетическое окно 150–350 кан., для ^{177}Lu – 0–150 кан. Значения радиоактивности изъятых органов и тканей пересчитывали для времени введения (нулевой временной точки) по формуле:

$$A_0 = A_1 \exp\left[\frac{\ln 2\,(T_1 - T_0)}{T_{1/2}}\right], \quad (1)$$

где A_0 – активность образца на момент введения (Бк), A_1 – активность образца на момент измерения активности (Бк), T_1 – время измерения активности (ч), T_0 – время введения (ч), $T_{1/2}$ – период полураспада (ч). Затем вычисляли показатель радиоактивности ткани в % от введенной активности в пересчете на 1 г ткани.

Статистическая обработка данных

При статистической обработке экспериментальных данных использовали программу GraphPad Prizm 10. Данные представлены в виде гистограмм с обозначением стандартного отклонения для каждого среднего значения. Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовали U-критерий Манна–Уитни. Результаты считались статистически достоверными при $p \leq 0{,}05$. Все результаты получены не менее чем в трёх повторах.

Результаты

Мышам вводили разные радиоконъюгаты, содержащие одинаковые радионуклиды, но отличавшиеся специфичностью векторных наноантител или хелатирующими агентами. Показано, что накопление радиоактивности в почках зависит от наноантитела на основании которого был синтезирован радиоконъюгат. Так, через 30 мин после введения [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu относительная радиоактивность почек была в 2 раза ниже, чем после введения [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 (52,9±13,1% против 98,6±14,7%). При этом через 1,5 ч после введения радиоконъюгатов относительная радиоактивность почек становилась одинаковой (рис. 1А). Через 30 мин после введения [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu относительная радиоактивность мочи была меньше, чем после введения [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 (44,8±43,8% против 801±470%), а через 1,5 ч достоверных отличий уже не было (рис. 1Б). Данные результаты демонстрируют, что радиоконъюгат [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 сначала быстрее накапливается в почках, чем [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu, а затем быстрее выводится из них. Не обнаружено зависимости относительной радиоактивности крови от введенного радиоконъюгата: через 30 мин и через 1,5 ч после введения [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu и [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 достоверных отличий по этому показателю не было (рис. 1 В). Относительная радиоактивность почек, мочи и мочевого пузыря была гораздо выше, чем остальных органов и тканей. При этом статистически достоверная зависимость относительной радиоактивности образцов от введенного радиоконъюгата обнаружена только для почек и мочи (рис. 1 Д).

Такая же зависимость накопления радиоактивности в почках от векторных наноантител, входящих в состав радиоконъюгатов, обнаружена и для соединений, содержащих ^{177}Lu (рис. 2 А). Через 24 ч после введения в кровоток [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 относительная радиоактивность почек была двукратно ниже, чем после введения [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 (23,9±2,1% против 46,7±3,6%). Интересно, что относительная радиоактивность мочи после введения [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 (рис. 2 Б) была также ниже (4,93±1,11% против 9,12±1,31%).

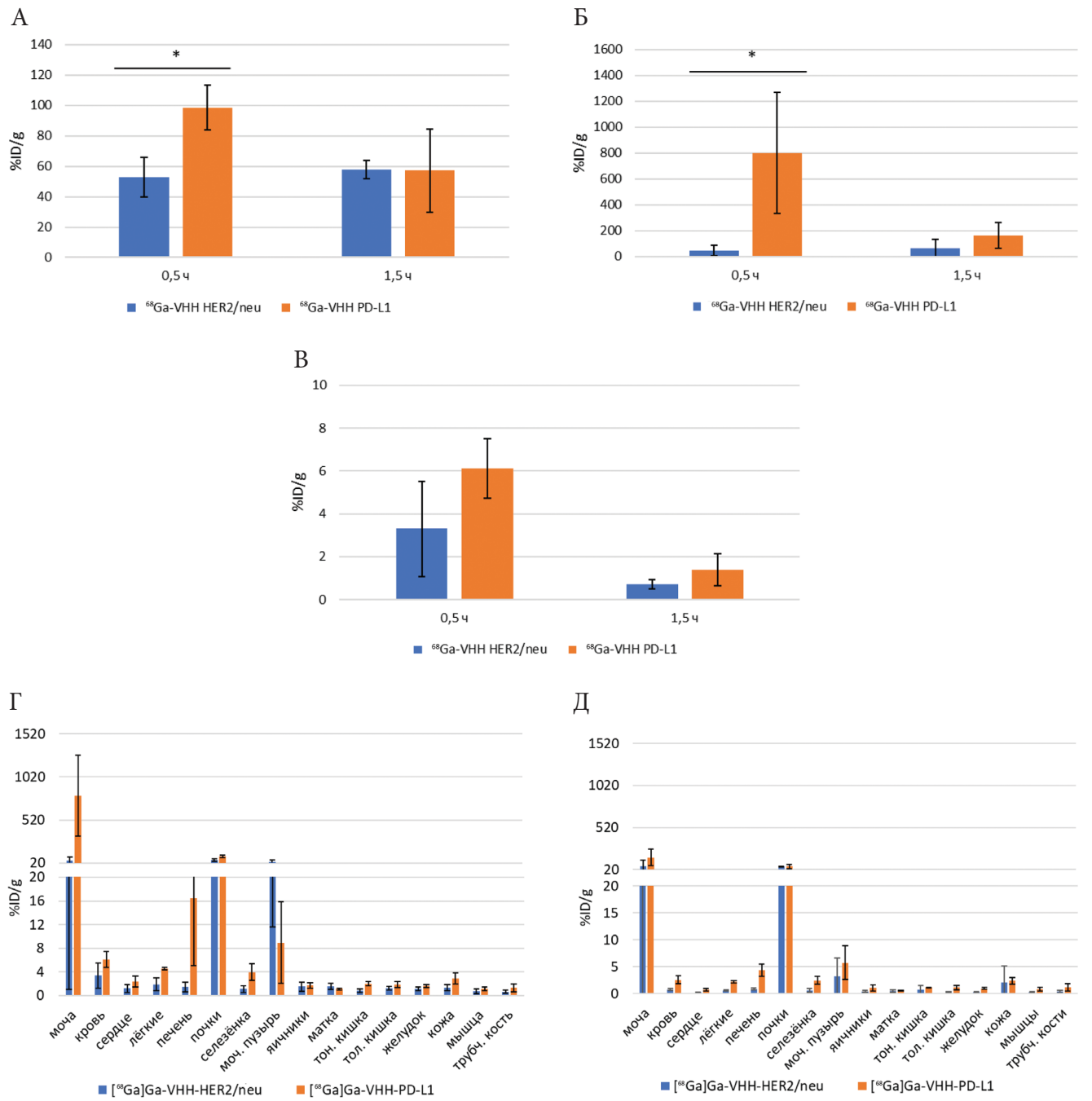


Рис. 1. Относительная радиоактивность органов и тканей после введения мышам [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu и [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1. А – радиоактивность почек, Б – радиоактивность мочи, В – радиоактивность крови, Г – биораспределение [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu и [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 через 0,5 ч после введения, Д – через 1,5 ч. По оси ординат: относительная радиоактивность 1 г органа или ткани, процентная доля от введенной дозы; по оси абсцисс: А, Б и В – время после введения; Г и Д – исследуемые образцы. * $p < 0,05$

Fig. 1. Relative radioactivity of organs and tissues after administration of [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu and [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 to mice. A – kidney radioactivity, Б – urine radioactivity, B – blood radioactivity, Г – biodistribution of [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu and [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 0.5 hours after administration, Д – 1.5 hours. Ordinate axis: relative radioactivity of 1 g of organ or tissue, percentage of the administered dose; abscissa axis: A, Б and B – time after administration; Г and Д – test samples. * $p < 0.05$

При этом через 24 ч после введения [^{177}Lu]Lu-VHH VEGRF2 и [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 относительная радиоактивность крови была в обоих случаях низкой, не превышая 0,2%, достоверных различий не наблюдалось. Относительные радиоактивности остальных органов и тканей также не различались, за исключением мочевого пузыря, радиоактивность которого после введения [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 была больше, чем после введения [^{177}Lu]Lu-VHH VEGRF2 (рис. 2 Б).

Подтверждена зависимость относительной радиоактивности почек от хелатора в составе радиоконъюгата. Замена DFO на p-SCN-Bn_DOTA при синтезе радиоконъюгата [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu уменьшала относительную радиоактивность почек примерно в два раза через 1 ч и через 2 ч после введения радиоконъюгата (рис. 3 А). Таким образом, показано, что выбор хелатирующего агента может влиять на накопление в почках радиоконъюгатов, созданных на основе наноантител. Относительная радиоактивность крови (рис. 3 Б), как и других органов и тканей (рис. 3 В) не зависела от хелатора радиоконъюгата.

Была исследована зависимость относительной радиоактивности почек от способа введения радиоконъ-

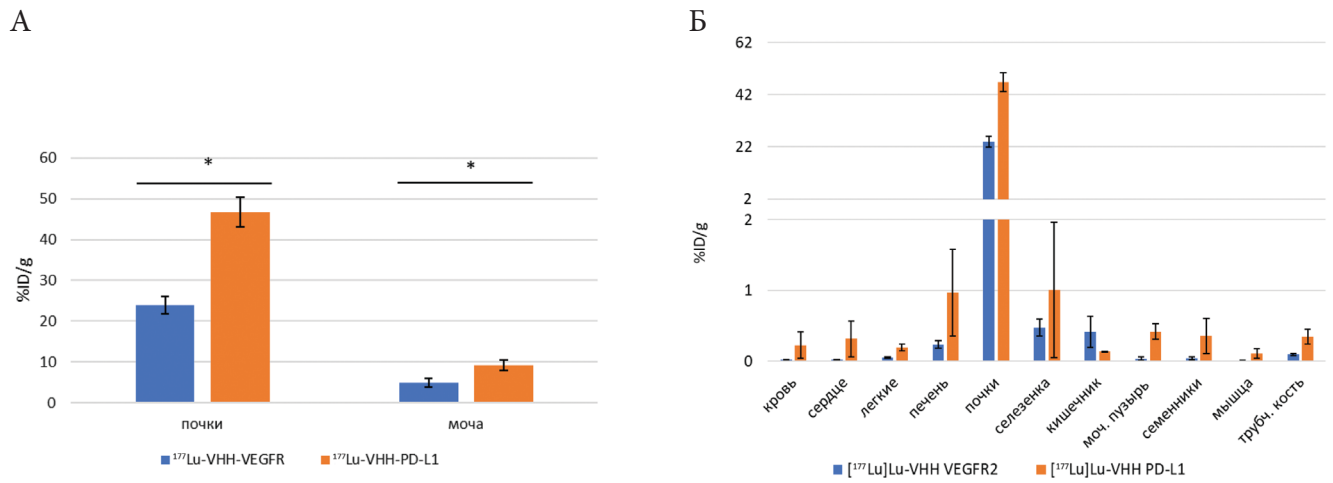


Рис. 2. Относительная радиоактивность органов и тканей через 24 ч после введения мышам [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 и [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1. А – радиоактивность почек и мочи, Б – биораспределение [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 и [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1. По оси ординат – относительная радиоактивность 1 г исследуемого образца, процентная доля от введенной дозы. * $p < 0,05$

Fig. 2. Relative radioactivity of organs and tissues 24 hours after administration of [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 and [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 to mice. A – radioactivity of the kidneys and urine, Б – biodistribution of [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 and [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1. Ordinate axis – relative radioactivity of 1 g of the test sample, as a percentage of the administered dose. * $p < 0.05$

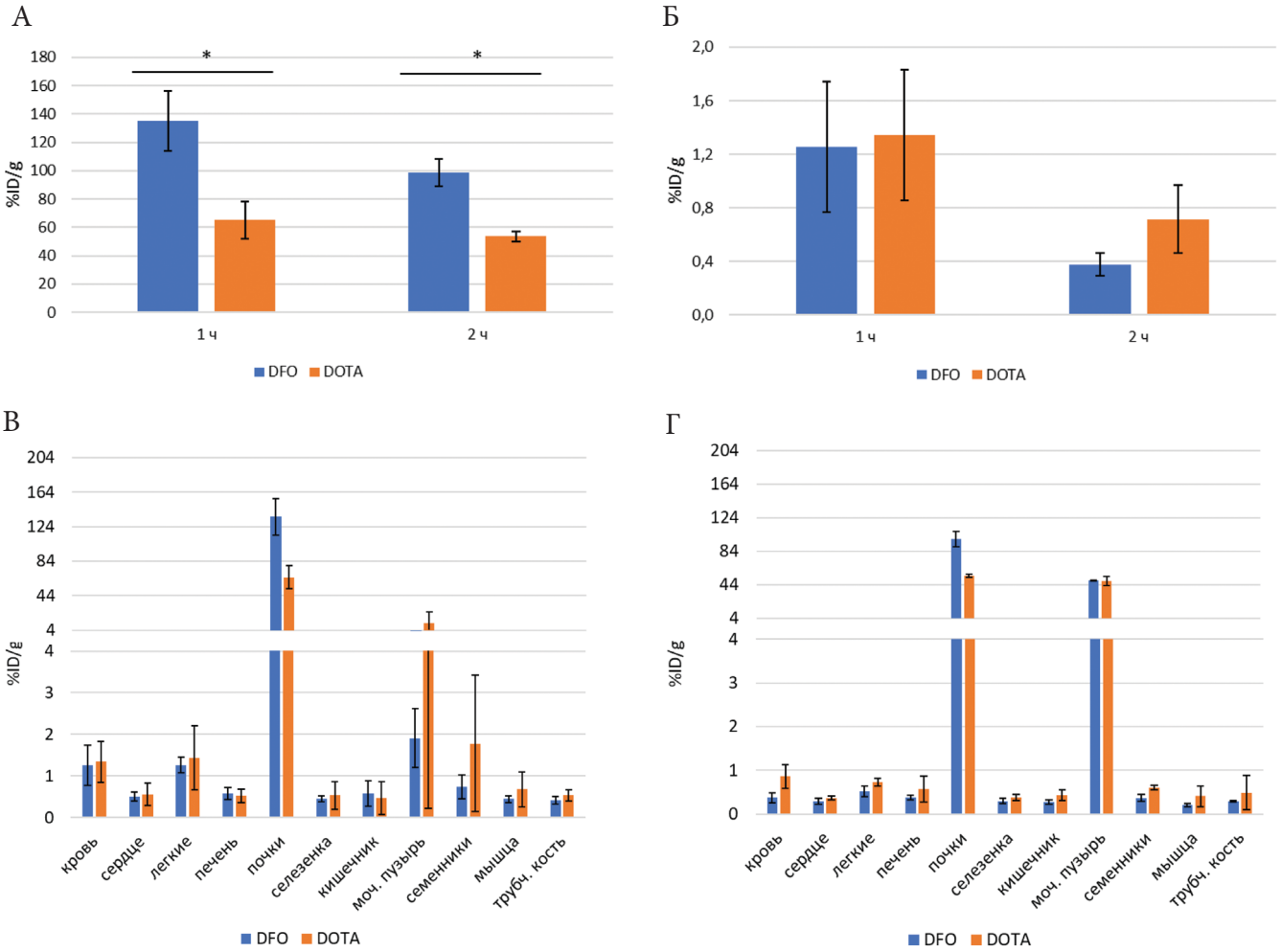


Рис. 3. Относительная радиоактивность органов и тканей после введения мышам [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu, содержащего DFO или DOTA в качестве хелатора. А – радиоактивность почек, Б – радиоактивность крови; В – бирораспределение [^{68}Ga]Ga-DFO-VHH HER2/neu и [^{68}Ga]Ga-DOTA-VHH HER2/neu через 1 ч после введения, Г – через 2 ч. По оси абсцисс – относительная радиоактивность 1 г исследуемого образца, процентная доля от введенной дозы; по оси ординат – А и Б – время после введения, В и Г – исследуемые образцы. * $p < 0,05$

Fig. 3. Relative radioactivity of organs and tissues after administration of [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu containing DFO or DOTA as a chelator to mice. A – kidney radioactivity, Б – blood radioactivity; B – bidistribution of [^{68}Ga]Ga-DFO-VHH HER2/neu and [^{68}Ga]Ga-DOTA-VHH HER2/neu 1 hour after administration, Г – after 2 hours. Abscissa axis – relative radioactivity of 1 g of test sample, percentage of the administered dose; ordinate axis – A and Б – time after administration, B and Г – test samples. * $p < 0.05$

югата. Через 4 ч после введения [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 в ретроорбитальный синус относительная радиоактивность почек была значительно ниже, чем после введения этого радиоконъюгата в хвостовую вену: 136±26% против 306±6%, соответственно. При подкожном введении [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 радиоактивность почек через 4 ч составила 96,1±19,0%, не отличаясь достоверно от их радиоактивности после введения радиоконъюгата через ретроорбитальный синус (рис. 4 А).

Не было обнаружено влияния способа введения [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 на радиоактивность мочи или крови. Возможно, это связано с достаточно большим временем между введением радиоконъюгата и взятием образцов для прямой радиометрии, при этом, пик выведения радиоактивности с мочой был пройден на более ранних сроках. Также не было обнаружено влияния способа введения [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 на его биораспределение в других органах и тканях (рис. 4 Б). Таким образом, через 4 часа после инъекции способ введения радиоконъюгата достоверно влиял на его содержание только в почках, но не на биораспределение в других органах и тканях.

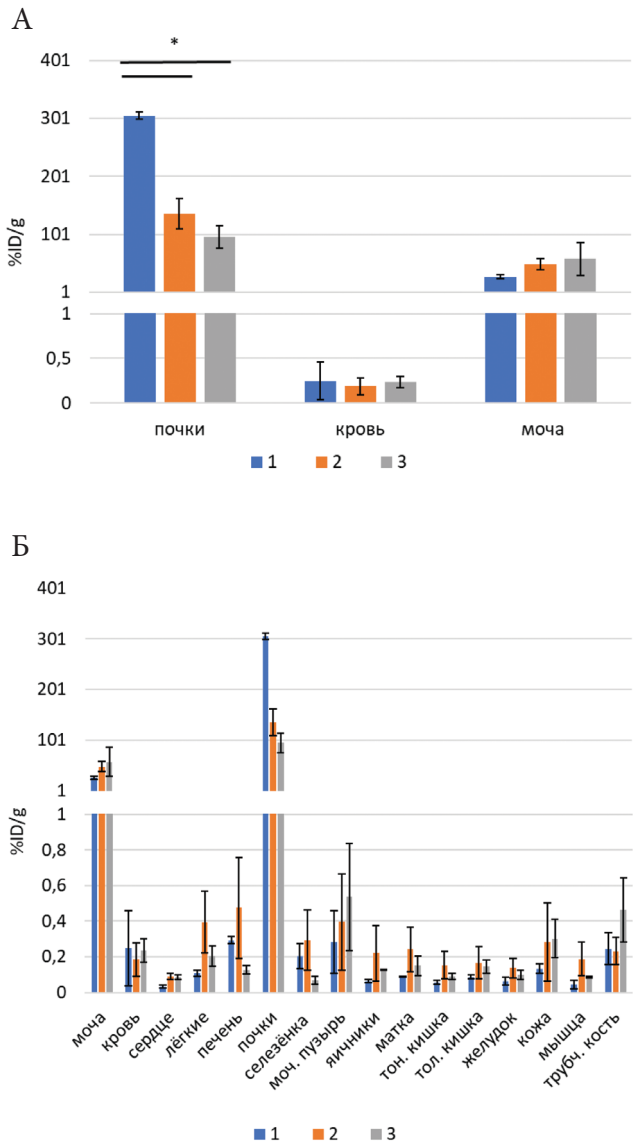


Рис. 4. Относительная радиоактивность органов и тканей через 4 ч после введения мышам [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1. А – радиоактивность почек, крови и мочи, Б – биораспределение [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 в организме мышей. По оси ординат – относительная радиоактивность 1 г исследуемого образца, процентная доля от введенной дозы. Легенда – способ введения радиоконъюгата: 1 – в хвостовую вену, 2 – в ретроорбитальный синус, 3 – подкожно 1. * $p < 0{,}001$

Fig. 4. Relative radioactivity of organs and tissues 4 hours after administration of [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 to mice. A – radioactivity of the kidneys, blood and urine, Б – biodistribution of [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 in the body of mice. Ordinate axis – relative radioactivity of 1 g of the test sample, a percentage of the administered dose. Legend – route of administration of the radioconjugate: 1 – into the tail vein, 2 – into the retroorbital sinus, 3 – subcutaneously 1. * $p < 0.001$

Мы полагали, что при подкожном введении (и, возможно, при введении в ретроорбитальный синус) радиоконъюгат попадает в кровоток медленнее, чем при введении в хвостовую вену. Это должно было бы снижать концентрацию радиоконъюгата в крови, что может, в свою очередь снижать его накопление в почках. Чтобы выяснить происходит ли действительно подобная задержка, мы исследовали относительную радиоактивность крови через 1 и 60 мин после введения [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 в хвостовую вену, подкожно и через ретроорбитальный синус. Также были измерены относительные радиоактивности мочи и почек (рис. 5). Не было обнаружено разницы между уровнями относительной радиоактивности крови через 1 и 60 мин после введения радиоконъюгата в хвостовую вену и в ретороорбитальный синус. Отсутствие разницы через 1 мин, показывает одинаковую скорость поступления радиоконъюгата в кровь при этих способах его введения. При этом через 1 мин после введения [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 подкожно относительная радиоактивность крови (0,324±0,026%) и почек (0,176±0,064%) была в десятки раз ниже, чем при введении в хвостовую вену (19,7±4,5% и 52,6±8,5% соответственно). Через 60 мин только относительная радиоактивность почек была меньше при введении подкожно, чем при введении в хвостовую вену, результаты отличались в 2 раза. что аналогично результатам, полученным через 4 ч после введения [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1. Таким образом, пролонгирование введения радиоконъюгатов в кровь при подкожном введении совпадает с уменьшением их содержания в почках.

Обсуждение

Ранее было показано, что структура радиоконъюгатов влияет на их накопление в почках мышей после введения в кровоток. Такое накопление зависит от линкеров, связывающих хелатор с векторной молекулой [11–14]. Показано, что радиоактивность почек зависит от хелатора и его расположения в составе радиоконъюгата, где он может быть присоединен к разным функциональным группам векторной молекулы [15, 16]. Так, накопление радиоактивно меченого наноантитела 2Rs15d в почках уменьшалось после удаления присоединенных к С-концу меток His-tag и Myc-His-tag [7]. Описанные изменения влияют на заряд и гидрофобные свойства радиоконъюгата. При этом нет установленных закономерностей, позволяющих точно предсказать, как изменится радиоактивность почек при изменении состава радиоконъюгата.

Мы не нашли в литературе прямого сравнения радиоактивности почек после введения мышам радиоконъюгатов, синтезированных на основе разных наноантител. В нашем исследовании показано, что радиоконъюгаты, содержащие одинаковые радионуклиды и хелаторы, но изготовленные на основе различных наноантител (пары [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu и [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1, [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 и [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L), существенно и достоверно различаются по накоплению в почках после их введения в кровоток. В настоящей работе различное накопление в почках демонстрировали радиоконъюгаты, специфичные к разным белкам. Однако разница

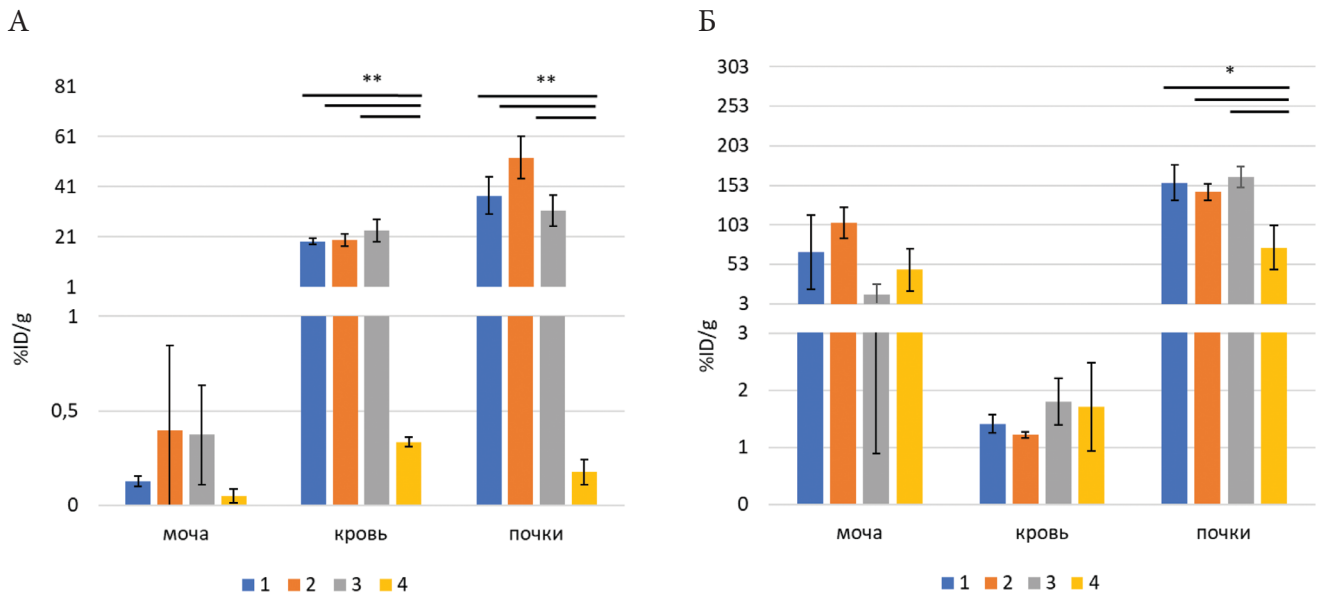


Рис. 5. Относительная радиоактивность мочи, крови и почек после введения мышам [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1. А – через 1 мин после введения, Б – через 60 мин. По оси абсцисс – относительная радиоактивность 1 г образца, процентная доля от введенной дозы. Легенда – способ введения радиоконъюгата: 1 – в хвостовую вену после наркотизации, 2 – в хвостовую вену без наркотизации, 3 – в ретроорбитальный синус, 4 – подкожно. *p < 0,05; **p < 0,001

Fig. 5. Relative radioactivity of urine, blood, and kidneys after administration of [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 to mice. A – 1 minute after administration, Б – 60 minutes after administration. Abscissa axis: relative radioactivity of 1 g of sample as a percentage of the administered dose. Legend – route of administration of the radioconjugate: 1 – into the tail vein after anesthesia, 2 – into the tail vein without anesthesia, 3 – into the retroorbital sinus, 4 – subcutaneously. *p <0.05; **p <0.001

в биораспределении радиоконъюгатов может не быть связана с их специфичностью. Аминокислотный состав векторной молекулы определяет её заряд и гидрофобные свойства, что может оказывать серьезное влияние на биораспределение радиоконъюгата, включая его поступление и задержку в почках. Нельзя также исключить, что биораспределение радиоконъюгата зависит от аффинности векторной молекулы.

Пробелом в наших знаниях является то, что ранее не было исследовано влияние способа введения радиоконъюгатов на накопление радиоактивности в почках. В доклинических исследованиях радиоконъюгаты мышам вводят в хвостовую вену или в ретроорбитальный синус. В последнее время много работ посвящено подкожному введению фармпрепаратов, что удобнее и дешевле, чем их внутривенное введение [17, 18]. Нами было показано, что при подкожном введении радиоконъюгат попадает в кровь медленнее, чем при введении в хвостовую вену. Соответственно, меньшая радиоактивность почек при таком введении, может быть объяснена пролонгированным временем попадания радиоконъюгата в кровоток. Попавшие в первичную мочу белки реабсорбируются в кровоток через транспортную систему проксимальных канальцев нефронов, в которой важную роль играют рецепторы мегалин и кубулин [1, 19]. При реабсорбции белковых радиоконъюгатов, содержащих изотопы металлов, радиоактивно меченые катаболиты задерживаются после лизосомальной деградации в эпителиальных клетках проксимальных канальцев [1, 20]. Возможно, более медленное попадание радиоконъюгата в кровоток приводит к меньшей нагрузке в единицу времени на транспортную систему, что в свою очередь приводит к уменьшению задержки радиоконъюгата или его метаболитов в ткани почек. Это предположение подтверждается сравнением значений относительной радиоактивности мочи и почек. Так, после введения [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu или [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 радиоактивность и мочи, и почек была ниже, чем после введения соответственно [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 или [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 (рис. 1 А, 1 Б). 2). Мы полагаем, что это совпадение не случайно, поскольку менее интенсивное выведение радиоконъюгатов с мочой должно быть следствием меньшей нагрузки на их транспорт при реабсорбции.

Заключение

Исследование, проведённое с использованием двух пар радиоконъюгатов ([^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu и [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1, [^{177}Lu]Lu-VHH VEGFR2 и [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L) показало, что накопление радиоактивности в почках при таргетной диагностике или терапии зависит от наноантитела, на основе которого изготовлен радиоконъюгат. Также показано, что такое накопление зависит и от хелатирующего агента. Так, после введения [^{68}Ga]Ga-VHH HER2/neu накопление в почках было меньше, если при изготовлении радиоконъюгата в качестве хелатирующего агента использовали p-SCN-Bn_DOTA вместо этилскваратного производного дефероксамина. Показано, что после подкожного введении [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 и [^{177}Lu]Lu-VHH PD-L1 радиоактивность почек была значительно и достоверно меньше, чем после введения в хвостовую вену или в ретороорбитальный синус. Этот эффект совпал с увеличением времени проникновения [^{68}Ga]Ga-VHH PD-L1 в кровь при подкожном введении. Это предполагает, что накопление радиоконъюгата в почках зависит от продолжительности его введения и, соответственно, от концентрации в крови. Полученные данные открывают новые пути снижения радиационной нагрузки на почки при таргетной терапии или диагностике.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Freise A.C., Wu A.M. In Vivo Imaging with Antibodies and Engineered Fragments. Mol. Immunol. 2015;67;2 Pt A:142–152. Doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.001.
2. Chigoho D.M., Bridoux J., Hernot S. Reducing the Renal Retention of low to Moderate-Molecular-Weight Radiopharmaceuticals. Curr. Opin. Chem. Bbiol. 2021;63:219–228. Doi: 10.1016/j.cbpa.2021.06.008.
3. Авров К.О., Шатик С.В., Шашкова О.А., Пиневич А.А., Терехина Л.А., Грязева И.В., Зайцев В.В., Берлина М.А., Станжевский А.А., Самойлович М.П. Оценка функциональной пригодности радиоиммуноконъюгатов наноантител против PD-L1 и HER2/NEU для тераностики опухолей // Современные технологии в медицине. 2026. Т.18. №2. С. 24–38 [Avrov K.O., Shatik S.V., Shashkova O.A., Pinevich A.A., Terekhina L.A., Gryazeva I.V., Zaytsev V.V., Berlina M.A., Stanzhevskiy A.A., Samoylovich M.P. Evaluation of the Functional Suitability of Radioimmunoconjugates of Nanoantibodies against PD-L1 and HER2/NEU for Tumor Theranostics. *Sovremennyye Tekhnologii v Meditsine* = Modern Technologies in Medicine. 2026;18;2:24–38 (In Russ.)].
4. Jin B.K., Odongo S., Radwanska M., Magez S. NANOBODIES®: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. Int. J. Mol. Sci. 2023;24;6:5994. Doi: 10.3390/ijms24065994.
5. Bridoux J., Broos K., Lecocq Q., Debie P., Martin C., Ballet S., Raes G., Neyt S., Vanhove C., Breckpot K., Devoogdt N., Caveliers V., Keyaerts M., Xavie C. Anti-Human PD-L1 Nanobody for Immuno-PET Imaging: Validation of a Conjugation Strategy for Clinical Translation. Biomolecules 2020;10;10:1388. Doi: 10.3390/biom10101388.
6. Zhao L., Gong J., Liao S., Huang W., Zhao J., Xing Y. Preclinical Evaluation and Preliminary Clinical Study of ^{68}Ga-NODAGA-NM-01 for PET Imaging of PD-L1 Expression. Cancer Imaging 2025;25;1:6. Doi: 10.1186/s40644-025-00826-8.
7. Gao H., Wu Y., Shi J., Zhang X., Liu T., Hu B., Jia B., Wan Y., Liu Z., Wang F. Nuclear Imaging-Guided PD-L1 Blockade Therapy Increases Effectiveness of Cancer Immunotherapy. J. Iimmunother. Cancer. 2020;8;2:e001156. Doi: 10.1136/jitc-2020-001156.
8. D'Huyvetter M., Vincke C., Xavier C., Aerts A., Impens N., Baatout S., De Raeve H., Muyldermans S., Caveliers V., Devoogdt N., Lahoutte T. Targeted Radionuclide Therapy with A ^{177}Lu-Labeled Anti-HER2 Nanobody. Theranostics. 2014;4;7:708-720. Doi: 10.7150/thno.8156.
9. Behr T.M., Becker W.S., Sharkey R.M., Juweid M.E., Dunn R.M., Bair H.J., Wolf F.G., Goldenberg D.M. Reduction of Renal Uptake of Monoclonal Antibody Fragments by Amino Acid Infusion. J. Nucl. Med. 1996;37;5:829-833. PMID: 8985154.
10. Авров К.О., Шатик С.В., Самойлович М.П. Способы уменьшения накопления радиоактивности в почках при таргетной терапии с использованием малых молекул, пептидов и фрагментов антител // Сибирский онкологический журнал. 2024. Т.3. №4. С. 162-171 [Avrov K.O., Shatik S.V., Samoylovich M.P. Methods for Reducing the Accumulation of Radioactivity in the Kidneys during Targeted Therapy using Small Molecules, Peptides and Antibody Fragments. *Sibirskiy Onkologicheskiy Zhurnal* = Siberian Journal of Oncology. 2024;3;4:162-171 (In Russ.)]. Doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-4-162-171.
11. Kuo H.T., Pan J., Zhang Z., Lau J., Merkens H., Hang C., Colpo N., Lin K.S., Bénard F. Effects of Linker Modification on Tumor-to-Kidney Contrast of ^{68}Ga-Labeled PSMA-Targeted Imaging Probes. Mol. Pharm. 2018;15:3502–3511. Doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00499.
12. Baranski A.C., Schäfer M, Bauder-Wüst U/, Wacker A/, Schmidt J., Liolios C., Mier W., Haberkorn U., Eisenhut M., Kopka K., Eder M. Improving the Imaging Contrast of ^{68}Ga-PSMA-11 by Targeted Linker Design: Charged Spacer Moieties Enhance the Pharmacokinetic Properties. Bioconjug. Chem. 2017;28;9:2485-2492. Doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00458.
13. Flook A.M., Yang J., Miao Y. Substitution of the Lys Linker with the β-Ala Linker Dramatically Decreased the Renal Uptake of ^{99m}Tc-labeled Arg-X-Asp-Conjugated and X-Ala-Asp-Conjugated α-Melanocyte Stimulating Hormone Peptides. J. Med. Chem. 2014;57;21:9010-8. Doi: 10.1021/jm501114v.
14. Hofström C., Altai M., Honarvar H., Strand J., Malmberg J., Hosseinimehr S.J., Orlova A., Gräslund T., Tolmachev V. HAHAHA, HEHEHE, HIHIHI, or HKHKHK: Influence of Position and Composition of Histidine Containing Tags on Biodistribution of [(99m)Tc(CO)3](+)-Labeled Affibody Molecules. J. Med. Chem. 2013;56;12:4966-74. Doi: 10.1021/jm400218y.
15. Guo H., Yang J., Gallazzi F., Prossnitz E.R., Sklar L.A., Miao Y. Effect of DOTA Position on Melanoma Targeting and Pharmacokinetic Properties of 111In-Labeled Lactam Bridge-Cyclized Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Peptide. Bioconjug. Chem. 2009;20;11:2162-8. Doi: 10.1021/bc9003475.
16. Mitran B., Thisgaard H., Rinne S., Dam J.H., Azami F., Tolmachev V., Orlova A., Rosenström U. Selection of an Optimal Macrocyclic Chelator Improves the Imaging of Prostate Cancer using Cobalt-Labeled GRPR Antagonist RM26. Sci. Rep. 2019;9;1:17086. Doi: 10.1038/s41598-019-52914-y.
17. George S., Bourlon M.T., Overman M.J., Dixon M., Shelley K., Markus K. J., Kewley R. M., Pope S. I., Albigès, L. Systematic Literature Review of Intravenous Versus Subcutaneous Administration of Oncology Therapies: a Clinical, Economic and Patient Perspective. Cancer Treat. Rev. 2025;139:102974. Doi: 10.1016/j.ctrv.2025.102974.
18. Stoner K.L., Harder H., Fallowfield L.J., Jenkins V.A. Intravenous Versus Subcutaneous drug Administration. Which do Patients Prefer? A Systematic Review. Patient. 2014 Jul 12;8;2:145-153. Doi: 10.1007/s40271-014-0075-y.
19. Ren Q.I., Baty C.J., Kashlan O.B., Eisz O.A. Distinct Functions of Megalin and Cubilin Receptors in Recovery of Normal and Nephrotic Levels of Filtered Albumin. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2020;318;5:F1284–F1294. Doi: 10.1152/ajprenal.00030.2020.
20. Vegt E., de Jong M., Wetzels J.F., Masereeuw R., Melis M., Oyen W.J., Gotthardt M., Boerman O.C. Renal Toxicity of Radiolabeled Peptides and Antibody Fragments: Mechanisms, Impact on Radionuclide Therapy, and Strategies for Prevention. J. Nucl. Med. 2010;51;7:1049-58. Doi: 10.2967/jnumed.110.075101.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ.

Участие авторов. *К.О. Авров, О.А. Шашкова и М.П. Самойлович* – план исследования, проведение экспериментальных работ с животными, обсуждение результатов. *С.В. Шатик и В.В. Зайцев* – синтез и характеристика радиоконъюгатов. *А.А. Пиневич, Л.А. Терехина, И.В. Грязева* – проведение экспериментальных работ с животными.

Поступила: 20.06.2026. Принята к публикации: 25.07.2026.

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

Financing. This work was supported by a state assignment from the Russian Ministry of Health.

Contribution. *K.O. Avrov, O.A. Shashkova* and *M.P. Samoylovich* designed the study and conducted animal experiments. *S.V. Shatik* and *V.V. Zaytsev* synthesized the radioconjugates. *A.A. Pinevich, L.A. Terekhova* and *I.V. Gryazeva* conducted animal experiments.

Article received: 20.06.2026. Accepted for publication: 25.07.2026.