

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПРИГОДНОСТИ РАДИОИММУНОКОНЬЮГАТОВ НАНОАНТИТЕЛ ПРОТИВ PD-L1 И HER2/neu ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ

DOI: 10.17691/stm2026.18.2.03

УДК 616–006:615.849

Поступила 04.06.2025 г.

© **К.О. Авров**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;
С.В. Шатик, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории радиофармацевтических технологий¹;
О.А. Шашкова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;
А.А. Пиневиц, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;
Л.А. Терехина, научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;
И.В. Грязева, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;
В.В. Зайцев, ведущий научный сотрудник лаборатории радиофармацевтических технологий¹;
М.А. Берлина, лаборант-исследователь лаборатории гибридной технологии¹;
А.А. Станжевский, д.м.н., зам. директора по научной работе¹;
М.П. Самойлович, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;
главный научный сотрудник кафедры цитологии и гистологии биологического факультета²

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. академика А.М. Гранова Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Ленинградская, 70, Санкт-Петербург, поселок Песочный, 197758;

²Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская набережная, 7/9, Санкт-Петербург, 199034

Цель исследования — оценить возможность использования радиоиммуноконъюгатов (РИК) нанoантител против PD-L1 и HER2/neu для диагностики и терапии злокачественных опухолей.

Материалы и методы. Нанoантитела к биомаркерам человека PD-L1 и HER2/neu конъюгировали с радионуклидами ⁶⁸Ga и ¹⁷⁷Lu с использованием хелатирующего агента DOTA. Биораспределение РИК исследовали в экспериментальных моделях на мышах F1(DBA/2xBALB/c), которым прививали генно-модифицированные клетки мышиной карциномы СТ26, экспрессирующие PD-L1 или HER2/neu человека. РИК, содержащие изотоп ⁶⁸Ga и предназначенные для выявления опухолей, вводили животным внутривенно в дозе 1,0–1,2 МБк. Накопление радиоактивности в специфических опухолях, несущих биомаркеры человека, оценивали методом прямой дозиметрии через 0,5, 1,5 и 4 ч в сравнении с контрольными опухолями. Для терапии использовали РИК, содержащие ¹⁷⁷Lu, которые вводили в дозе 0,8–1,6 МБк и исследовали аналогично в течение 96 ч после введения.

Для контактов: Авров Кирилл Олегович, e-mail: kirillavrov@hotmail.com

Результаты. После введения мышам РИК, содержащих ^{68}Ga , наибольшую разницу между специфическими и контрольными опухолями наблюдали на сроке 1,5 ч. В это же время отмечалось многократное превышение радиоактивности специфической опухоли над радиоактивностью крови и мышечной ткани, что должно обеспечивать высокую контрастность визуализации. После введения мышам РИК, содержащих ^{177}Lu , радиоактивность в специфических опухолях сохранялась в течение 48 ч, что создавало длительное воздействие радиоизотопа на опухоль. При введении всех РИК происходила быстрая элиминация радиоактивности из крови через мочу, что было связано с использованием наноантител, имеющих молекулярную массу 13 кДа и не содержащих участков взаимодействия с Fc-рецепторами. Отмечено значительное накопление и длительное сохранение радиоактивности в почках. В работе была выявлена зависимость биораспределения радиоактивности от использованного изотопа: нормализованная по времени радиоактивность ряда органов и тканей, включая опухоли, после введения РИК, содержащих ^{68}Ga , была выше, чем после введения РИК той же специфичности, но содержащих радиоизотопы ^{177}Lu .

Заключение. Результаты исследования указывают на функциональную пригодность пар РИК наноантител с радиоизотопами ^{68}Ga и ^{177}Lu для тераностики злокачественных опухолей, экспрессирующих биомаркеры PD-L1 и HER2/neu.

Ключевые слова: радиоиммуноконъюгаты; наноантитела; радионуклиды; PD-L1; HER2/neu; тераностика.

Как цитировать: Avrov K.O., Shatik S.V., Shashkova O.A., Pinevich A.A., Terekhina L.A., Gryazeva I.V., Zaitsev V.V., Berlina M.A., Stanzhevsky A.A., Samoylovich M.P. Functional suitability evaluation of radioimmunoconjugates of nanobodies against PD-L1 and HER2/neu for tumor theranostics. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2026; 18(2): 24, <https://doi.org/10.17691/stm2026.18.2.03>

Это статья с открытым доступом, распространяемая по лицензии CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

English

Functional Suitability Evaluation of Radioimmunoconjugates of Nanobodies against PD-L1 and HER2/neu for Tumor Theranostics

K.O. Avrov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Hybridoma Technology¹;

S.V. Shatik, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Radiopharmaceutical Technologies¹;

O.A. Shashkova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Hybridoma Technology¹;

A.A. Pinevich, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Hybridoma Technology¹;

L.A. Terekhina, Researcher, Laboratory of Hybridoma Technology¹;

I.V. Gryazeva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Hybridoma Technology¹;

V.V. Zaitsev, Leading Researcher, Laboratory of Radiopharmaceutical Technologies¹;

M.A. Berlina, Research Assistant, Laboratory of Hybridoma Technology¹;

A.A. Stanzhevsky, MD, DSc, Deputy Director for Research¹;

M.P. Samoylovich, DSc, Chief Researcher, Laboratory of Hybridoma Technology¹;
Chief Researcher, Department of Cytology and Histology, Faculty of Biology²

¹Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies named after Academician A.M. Granov, Ministry of Health of the Russian Federation, 70 Leningradskaya St., Saint Petersburg, Pesochny Settlement, 197758, Russia;

²Saint Petersburg State University, Universitetskaya Embankment, 7/9 Saint Petersburg, 199034, Russia

The aim of the study was to evaluate the applicability of radioimmunoconjugates (RIC) of nanobodies against PD-L1 and HER2/neu for the diagnosis and therapy of malignant tumors.

Materials and Methods. The nanobodies to human biomarkers PD-L1 and HER2/neu were conjugated with radionuclides ^{68}Ga and ^{177}Lu using the chelating agent DOTA. RIC biodistribution was studied in experimental models on F1 (DBA/2xBALB/c) mice, which were inoculated with genetically modified CT26 murine carcinoma cells expressing human PD-L1 or HER2/neu. RICs containing the isotope ^{68}Ga and intended for tumor detection were administered to animals intravenously at a dose of 1.0–1.2 MBq. In 0.5, 1.5, and 4 h the radioactivity accumulation in specific tumors carrying human biomarkers was assessed using direct dosimetry compared with control tumors. RICs containing ^{177}Lu were administered for therapy at a dose of 0.8–1.6 MBq, and studied similarly for 96 h after administration.

Results. After RICs containing ^{68}Ga were administered to mice, the greatest difference between specific and control tumors was observed in 1.5 h. At the same time, there was a multiple excess of the specific tumor radioactivity over the blood and muscle tissue radioactivity, which should provide high contrast imaging. After administering RICs containing ^{177}Lu to mice, the radioactivity in specific tumors persisted for 48 h producing a long-term effect of the radioisotope on the tumor. With the introduction of all RICs, there was a rapid elimination of radioactivity from the blood through urine, which was associated with the use of nanobodies with a molecular weight of 13 kDa and not containing sites of interaction with Fc receptors. There were found the significant accumulation and long-term retention of radioactivity in the kidneys. The work revealed a dependence of the radioactivity biodistribution on the isotope used: the time-normalized radioactivity of some organs and tissues, including tumors, after the administration of RICs containing ^{68}Ga appeared to be higher than after administering the RICs of the same specificity, but containing ^{177}Lu radioisotopes.

Conclusion. The findings indicated the functional suitability of the pairs of RIC nanobodies with ^{68}Ga and ^{177}Lu radioisotopes for theranostics of malignant tumors expressing PD-L1 and HER2/neu biomarkers.

Key words: radioimmunoconjugates; nanobodies; radionuclides; PD-L1; HER2/neu; theranostics.

Введение

Использование селективных радиоко́нъюгатов, специфичных к биомаркерам, открыло новые возможности для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Радионуклид в таких радиофармпрепаратах присоединен к направленному на мишень вектору: целому моноклональному антителу, его фрагменту, каркасному белку, пептидному лиганду или другой небольшой молекуле. Тераностикой в радионуклидной терапии называют использование связывающейся с одной молекулярной мишенью пары радиофармацевтических препаратов, один из которых применяется для диагностики, а другой — для терапии опухолей. Тераностика открывает большие возможности для персонализированной терапии опухолей, позволяя заранее оценить эффективность того или иного подхода при лечении пациента [1]. В последнее десятилетие в тераностике опухолевых заболеваний достигнут большой прогресс. Он прежде всего связан с использованием лигандов соматостатинового рецептора (SSTR), а также лигандов простатспецифического мембранного антигена (PSMA), меченных радионуклидами ^{68}Ga и ^{177}Lu [2–4].

Белки PD-L1 и HER2/neu представляют собой хорошо изученные биомаркеры опухолевых заболеваний. PD-L1 является лигандом рецептора программируемой клеточной гибели PD1. Он конститутивно экспрессируется в ряде клеток иммунной системы, в некоторых эпителиальных клетках и клетках многих опухолей. Этот белок является одной из ключевых контрольных точек иммунитета, которую опухолевые клетки используют для уклонения от иммунного ответа. Связывание PD-L1 на поверхности антиген-презентирующих клеток с рецептором PD1, экспрессируемым Т-лимфоцитами, приводит к подавлению пролиферации и цитотоксичности Т-лимфоцитов, а также к продукции ими цитокинов [5, 6]. При этом экспрессия PD-L1 на поверхности опухолевых клеток может блокировать иммунный ответ, способствуя росту опухоли [7–9]. Тирозинкиназа HER2/neu (рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа) является белком семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Гетеродимеризация этого белка с другими членами семейства, а также его гомодимеризация приводят к активации сигнальных каскадов и пролиферации клеток [10–12]. При раке молочной железы, желудка, яичников, легких и матки часто наблюдается повышенная экспрессия HER2/neu, ведущая к его димеризации и, как следствие, к постоянной активации сигнальных путей [10]. Для терапии опухолей с повы-

шенной экспрессией PD-L1 и HER2/neu применяют блокировку этих биомаркеров моноклональными антителами, а также используют конъюгаты антитело–лекарство [8, 13].

Гиперэкспрессия PD-L1 и HER2/neu связана с агрессивным развитием заболевания, при этом возможно использование для терапии конъюгатов, специфически связывающихся с этими биомаркерами. Отсутствие выраженной экспрессии PD-L1 и HER2/neu на поверхности опухолевых клеток делает нецелесообразным селективное воздействие на эти белки. Таким образом, определение уровня экспрессии PD-L1 и HER2/neu имеет большую прогностическую ценность и необходимо при выборе терапии. Для оценки уровня экспрессии применяется инвазивная биопсия с последующим иммуногистохимическим анализом, что является стандартной практикой при лечении пациентов. Однако этот метод не учитывает пространственную гетерогенность и временную динамику экспрессии PD-L1 и HER2/neu. Соответственно, неинвазивное определение статуса этих биомаркеров с использованием методов визуализации, прежде всего позитронно-эмиссионной томографии, является важным дополнением для исследования с применением иммуногистохимии.

Создание тераностических пар радиофармпрепаратов для диагностики и лечения опухолей, специфически связывающихся с PD-L1 или с HER2/neu, является актуальной задачей. В настоящей работе мы исследовали радиоиммуноконъюгаты (РИК), изготовленные на основе наноантител против PD-L1 и HER2/neu. Наноантитела, имеющие массу 12–15 кДа, представляют собой антигенсвязывающие VHH-фрагменты, образованные только тяжелыми цепями антител IgG, которые обнаружены в семействе парнокопытных млекопитающих *Camelidae*. Эти наноантитела также называются VHH-антителами. Наноантитела, имеющие массу 12–15 кДа, обладают меньшей иммуногенностью и значительно большей стабильностью, чем целые моноклональные антитела с массой 150 кДа [14]. Поскольку наноантитела не гликозилированы, их можно получать, в отличие от моноклональных антител, в прокариотах, снижая этим стоимость производства. Петля домена CDR3 у наноантител длиннее, чем у обычных IgG, что вместе с малым размером позволяет наноантителам связываться со скрытыми эпитопами [15]. В последние годы опубликованы работы по изучению радиофармпрепаратов на основе наноантител, включая публикации об исследованиях РИК наноантител против PD-L1 и HER2/neu [16–23].

При использовании тераностической пары радиофармацевтических препаратов желательно, чтобы они различались только радионуклидами, а векторные молекулы были бы одинаковыми. Этот подход облегчает стандартизацию и упрощает логику изготовления радиоконъюгатов, что повышает качество лечения и снижает его стоимость. Нами были синтезированы две тераностические пары РИК, каждая на основе одного наноантитела: ^{68}Ga -VНН PD-L1 и ^{177}Lu -VНН PD-L1, ^{68}Ga -VНН HER2/neu и ^{177}Lu -VНН HER2/neu. При их изготовлении был использован один хелатирующий агент DOTA и радионуклиды ^{68}Ga и ^{177}Lu . Галлий-68 — изотоп с периодом полураспада 68 мин, излучающий позитроны и применяемый для диагностики при помощи позитронно-эмиссионной томографии [24]. Лютеций-177 — изотоп с периодом полураспада 6,65 сут, являющийся источником β -излучения и используемый для терапии опухолей [25].

Цель исследования — изучение функциональной пригодности (возможности применения) РИК наноантител против PD-L1 и HER2/neu для диагностики и терапии опухолей. Для этого были определены специфичность связывания РИК с целевым антигеном опухоли и динамика биораспределения РИК в организме мышей.

Материалы и методы

Аффинные к PD-L1 человека и к HER2/neu антитела. Объектами исследования служили конъюгированные с радиоизотопами рекомбинантные однодоменные тяжело-цепные антитела (наноантитела, VНН), распознающие эпитоп PD-L1 (VНН-PD-L1) и HER2/neu (VНН-HER2/neu) человека (предоставлены ООО «Иннова плюс», Россия).

Синтез РИК. Для получения хелатирующих предшественников использовали наноантитела, специфичные к биомаркерам PD-L1 и HER2/neu, и коммерчески доступный бифункциональный хелатирующий агент p-SCN-Bn_DOTA (Macrocyclics, США). Для синтеза РИК, содержащих ^{68}Ga , применяли элюат генератора галлия-68 (АО «Циклотрон», Россия) в виде раствора хлорида галлия в 0,1 М хлористоводородной кислоты. К 100 мкг хелатирующего предшественника, растворенного в 20 мкл 50 мМ аммоний-ацетатного буфера (pH=7,5), добавляли 100 мкл 50 мМ аммоний-ацетатного буфера (pH=7,5) и 100 мкл элюата генератора, содержащего 30–50 МБк ^{68}Ga . Реакционную смесь инкубировали в течение 15 мин с использованием термощейкера TS-100С (SIA Biosan, Латвия) при 1000 об./мин и 70°C в защитном ламинарном боксе. Специфическая активность РИК составляла 0,3–0,5 МБк/мкг.

Для получения РИК, содержащих ^{177}Lu , использовали раствор хлорида лютеция (^{177}Lu) без носителя в 0,1 М HCl (ГНЦ НИИАР ГК Росатом, Россия). 100 мкг хелатирующего предшественника разбав-

ляли 100 мкл 50 мМ раствора ацетата аммония. Полученную смесь подкисляли 22,5 мкл 0,1 М соляной кислоты до значения pH, равного ~5,5–5,8, и добавляли ^{177}Lu LuCl₃ (15–45 МБк, 2,5 мкл). Радиомечение ^{177}Lu проводили в закрытой пробирке при 37°C в течение 60 мин в присутствии кислорода воздуха, перемешивали в термощейкере (1000 об./мин) в защитном ламинарном боксе.

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

Оценка специфического связывания РИК с антигенами с помощью магнитных частиц. Специфическую активность РИК определяли, как описано ранее [26], используя коммерчески доступные магнитные частицы, покрытые протеином А (SureBeads, кат. №161–4013; Bio-Rad, США; MagBeads, кат. №L00273; MagBio Genomics, США или SileksMag, кат. №K0181; SileksMag, Россия). Для этого специфический антиген, конъюгированный с Fc-фрагментом (PD-L1-Fc или HER2/neu-Fc), иммобилизовывали на магнитных частицах. Затем частицы инкубировали с раствором РИК (0,5–4,0 мкг/мл). После отмывания частиц от несвязавшегося РИК измеряли их радиоактивность с помощью радиометра активности радионуклидов Triathler и программного обеспечения Triathler Becquerel Finder (Hidex, Финляндия). Для контроля РИК инкубировали с частицами, не покрытыми антигеном. Показателем специфического связывания РИК служила доля радиоактивности, связавшейся с покрытыми антигеном частицами, от радиоактивности, исходно добавленной в инкубационную пробу. Тестированию *in vivo* подвергали РИК, у которых доля радиоактивности, специфически связавшейся с белками-мишенями на магнитных частицах, составляла 70–90% от радиоактивности, добавленной в пробу.

Биологические модели для тестирования РИК *in vivo*. Исследование динамики биораспределения РИК проводили с помощью разработанных нами биологических моделей. Для тестирования РИК на основе VНН-PD-L1 использовали клетки штамма CT26-PD-L1, представляющие собой генномодифицированные клетки CT26 карциномы кишечника мышей BALB/c, экспрессирующие на мембране PD-L1 человека. Создание и характеристики биологической модели, основанной на этих клетках, описаны ранее [27]. Для оценки динамики биораспределения РИК, созданных на основе наноантител VНН-HER2/neu, использовали клетки штамма CT26-HER2/neu, которые были созданы также методом генной инженерии. Их получение и основные свойства описаны ниже.

Биологическая модель для тестирования РИК на основе VHH-HER2/neu. Штамм СТ26-HER2/neu был получен методом ретровирусной трансдукции клеток мышины карциномы СТ26 плазмидой pQCXIP-HER2/neu. Донором кДНК HER2/neu для создания вектора служили клетки меланомы человека линии MeWo. Клетки штамма СТ26-HER2/neu, в отличие от родительских мышинных клеток СТ26, имели высокую экспрессию гена и белка HER2/neu человека, что было подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и проточной иммуноцитофлуориметрии (рис. 1). Штамм обладал высокой стабильностью и сохранял исходный уровень экспрессии биомаркера в процессе культивирования на протяжении 15 пассажей (срок наблюдения) как в присутствии селективного антибиотика, так и при его отсутствии. При подкожном введении 5 млн клеток СТ26-HER2/neu сублетально облученным мышам F1(DBA/2xBALB/c) на 9–11-й дни у животных формировались солидные опухоли объемом 100–500 мм³. Содержание клеток, имеющих на мембране HER2/neu человека, на 15–17-е сутки роста опухолей составляло 30–40% (рис. 1, б). После эксплантации и культивирования *in vitro* клеток из этих опухолей в течение 11 сут содержание HER2/neu-позитивных клеток возрастало до 99%, что свидетельствовало о высокой стабильности экспрессии биомаркера клетками штамма СТ26-HER2/neu (рис. 1, в). Количество молекул HER2/neu, определенное путем связывания с РИК, составило 1,6 млн на клетку.

Эксперименты на животных. Эксперименты проводили на мышах F1(DBA/2xBALB/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 одобрено

этическим комитетом Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. академика А.М. Гранова (Санкт-Петербург, Россия). В день начала эксперимента мышей облучали на терапевтическом рентгеновском аппарате (доза 5 Гр). Эта доза облучения была подобрана в серии предварительных экспериментов с целью снизить иммунореактивность животных в отношении антигенов человека. Облучение мышей в дозе 5 Гр не вызывало гибели животных в течение 6 мес. В контрольных опытах использовали необлученных интактных мышей. Клетки СТ26-PD-L1 или СТ26-HER2/neu, стабильно экспрессирующие на мембране биомаркеры человека, трансплантировали подкожно в количестве 5·10⁶ клеток на мышью в правый бок животного. Под кожу левого бока вводили 1 млн контрольных клеток СТ26, не экспрессирующих биомаркеры человека.

Исследование динамики биораспределения РИК методом прямой радиометрии. В исследование брали мышей на 9–13-е сутки после трансплантации опухолевых клеток. Животных наркотизировали (Золетил 100, 30 мг/кг, и ксилает, 8 мг/кг, внутримышечно), после чего в ретроорбитальный венозный синус вводили по 100 мкл растворов РИК. Объемная активность РИК, содержащих ⁶⁸Ga, составляла 10–12 МБк/мл, ¹⁷⁷Lu — 8–16 МБк/мл.

Через 0,5, 1,5, 4, 24, 48 и 96 ч после введения антител, конъюгированных с радиоизотопом ¹⁷⁷Lu (время полураспада 6,65 сут), или через 0,5, 1,5 и 4 ч после введения антител, меченных радиоизотопом ⁶⁸Ga (время полураспада 68 мин), проводили исследование биораспределения в организме экспериментальных животных. Для этого мышей 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 ра-

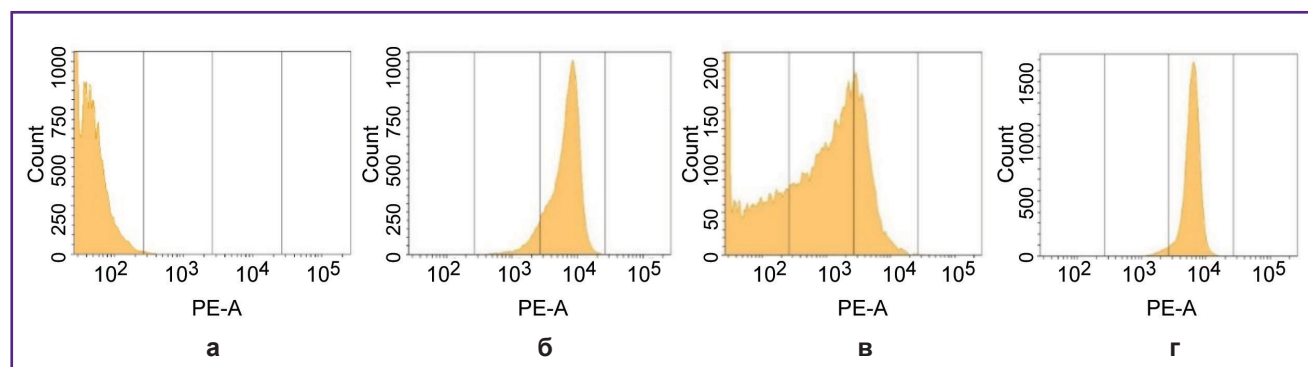


Рис. 1. Выявление экспрессии HER2/neu человека методом проточной иммуноцитофлуориметрии на родительских мышинных клетках СТ26 (а) и на рекомбинантных клетках СТ26-HER2/neu в культуре (б); в суспензии клеток опухоли, извлеченной на 15-е сутки после трансплантации мышью клеток СТ26-HER2/neu (в), и в той же суспензии клеток из опухоли после 11 сут культивирования *in vitro* (г)

дионуклидов Triathler (Hidex, Финляндия), используя для ^{68}Ga энергетическое окно 150–350 каналов, для ^{177}Lu — 0–150 каналов. Значения радиоактивности изъятых органов и тканей пересчитывали для времени вскрытия (нулевой временной точки) по формуле: $A_0 = A_{T_1} \cdot e^{(\ln(2) \cdot (T_1 - T_0) / T_{1/2})}$, где A_0 — активность образца на момент вскрытия, Бк; A_{T_1} — активность образца на момент измерения активности, Бк; T_1 — время измерения активности, ч; T_0 — время вскрытия, ч; $T_{1/2}$ — период полураспада, ч. Затем вычисляли показатель радиоактивности ткани в процентах 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 ($m \pm \sigma$). Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовали U-критерий Манна–Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Все результаты получены не менее чем в трех повторах.

Результаты

Чтобы исследовать биораспределение РИК, были созданы модели опухолей человека. Для их создания мышам F1(DBA/2xBALB/c) вводили мышинные генно-модифицированные клетки СТ26-PD-L1 или СТ26-HER/neu, экспрессирующие человеческие биомаркеры опухолей PD-L1 или HER2/neu. Этим же животным прививали контрольную опухоль введением мышинных клеток СТ26. Для образования опухолей иммунореактивность мышей была предварительно снижена сублетальной дозой рентге-

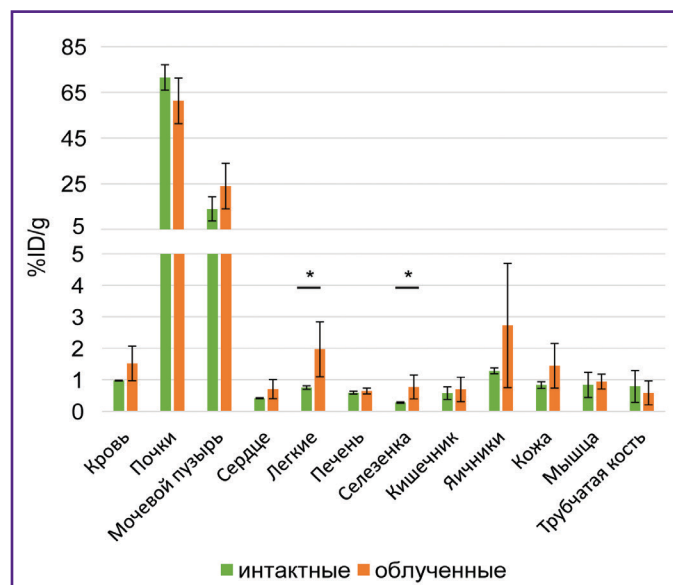
новского облучения (5 Гр). Влияние рентгеновского облучения на биораспределение РИК не обнаружено: после введения ^{68}Ga -VHH HER2/neu накопление радиоактивности в органах и тканях мышей, облученных за 8 сут до вскрытия, не отличалась от такого накопления у необлученных (рис. 2). Аналогичные результаты получены после введения ^{177}Lu -VHH PD-L1 (данные не показаны).

Биораспределение ^{68}Ga -VHH PD-L1 или ^{68}Ga -VHH HER2/neu исследовали через 0,5, 1,5 и 4 ч после введения в кровь мышей. Установлено, что происходило быстрое удаление радионуклида ^{68}Ga из кровотока мышей через мочевыделительную систему (рис. 3). Через 1,5 ч радиоактивность крови не превышала в среднем 2,5%. (Здесь и далее радиоактивность будет представлена в процентах от введенной дозы на 1 г веса ткани.) При этом обнаружено значительное накопление радиоактивности в почках, причем оно было максимальным через 30 мин после введения ^{68}Ga -VHH PD-L1 и через 1,5 ч после введения ^{68}Ga -VHH HER2/neu. Вероятно, это связано с более интенсивным выведением ^{68}Ga -VHH PD-L1 с мочой.

Через 1,5 и 4 ч после введения ^{68}Ga -VHH PD-L1 или ^{68}Ga -VHH HER2/neu радиоактивность специфической опухоли была выше, чем контрольной (рис. 4). Это показывает наличие селективного связывания РИК с целевыми биомаркерами PD-L1 и HER2/neu, экспрессируемыми клетками специфической опухоли. Общей закономерностью после введения этих РИК было быстрое снижение радиоактивности контрольной опухоли, в результате чего наибольшее превышение радиоактивности специфической опухоли над радиоактивностью контрольной достигалось через 1,5 ч. Максимальное значение радиоактивности в специфической опухоли

Рис. 2. Биораспределение радиоиммуноконъюгатов ^{68}Ga -VHH HER2/neu через 1 ч после введения интактным мышам и мышам, облученным за 8 дней до вскрытия рентгеновским излучением в дозе 5 Гр

По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $m \pm \sigma$; * $p < 0,05$



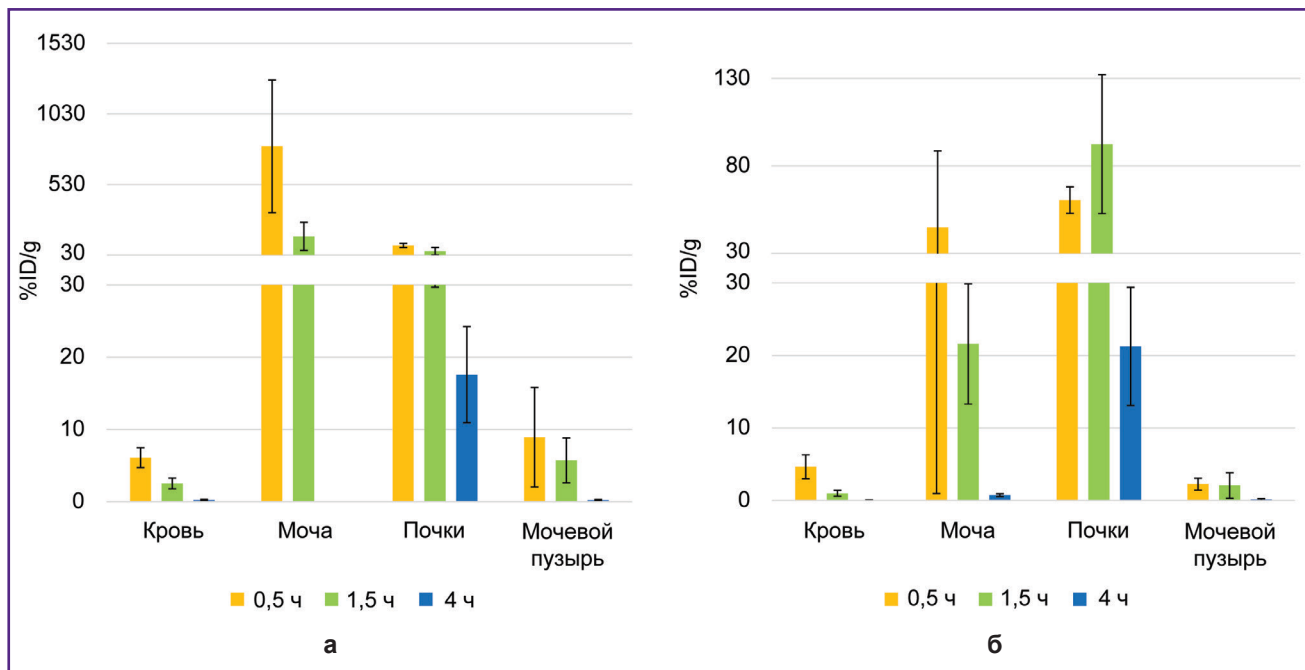


Рис. 3. Изменение радиоактивности крови, мочи, почек и мочевого пузыря после введения радиоиммуноконъюгатов:
 а — ^{68}Ga -VNH PD-L1; б — ^{68}Ga -VNH HER2/neu. По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $m \pm \sigma$

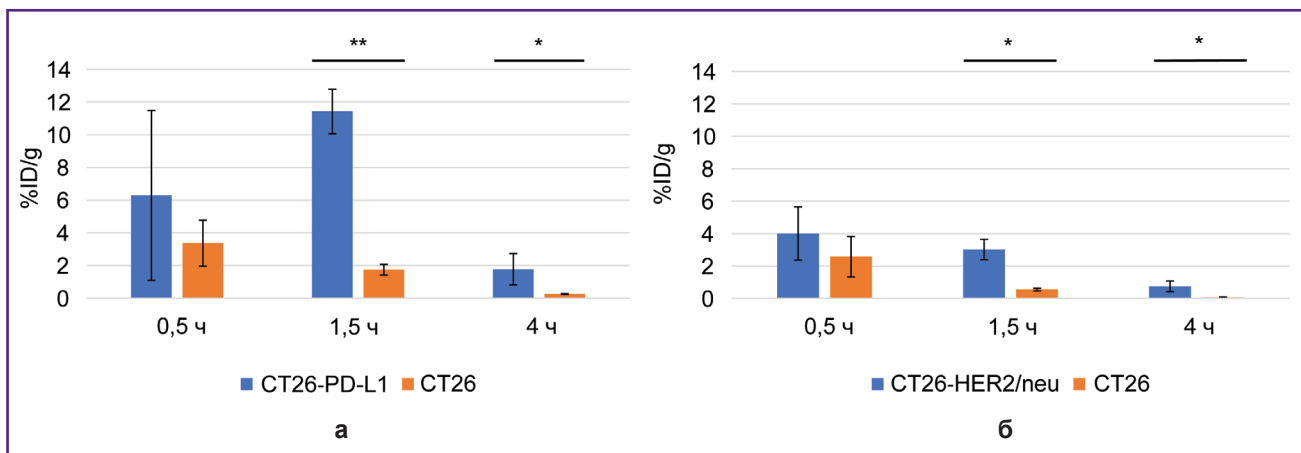


Рис. 4. Радиоактивность специфической и неспецифической опухолей после введения радиоиммуноконъюгатов:
 а — ^{68}Ga -VNH PD-L1; б — ^{68}Ga -VNH HER2/neu. По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $m \pm \sigma$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

^{68}Ga -VNH PD-L1 составило в среднем 11,4% после введения ^{68}Ga -VNH PD-L1 и 4,0% после введения ^{68}Ga -VNH HER2/neu (см. рис. 4). Благодаря селективному связыванию ^{68}Ga -VNH PD-L1 и ^{68}Ga -VNH HER2/neu радиоактивность в специфической опухоли была больше, чем радиоактивность в других органах и тканях, за исключением почек (рис. 5). Данная разница была статистически значимой для крови и мышечной ткани через 1,5 и 4 ч (рис. 6), при-

чем через 1,5 ч она была наибольшей. Это должно обеспечивать контрастность визуализации при диагностике опухолей с использованием позитронно-эмиссионной томографии. Так, через 1,5 ч после введения ^{68}Ga -VNH PD-L1 радиоактивность специфической опухоли превышала радиоактивность в крови в 4,5 раза, в мышечной ткани — в 14,1 раза. Для ^{68}Ga -VNH HER2/neu это превышение составило соответственно 3,1 и 9,4 раза.

Рис. 5. Динамика биораспределения радиоиммуноконъюгатов в организме мышей с опухолями:
 а — ^{68}Ga -VНН PD-L1, б — ^{68}Ga -VНН HER2/neu. По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $m \pm \sigma$

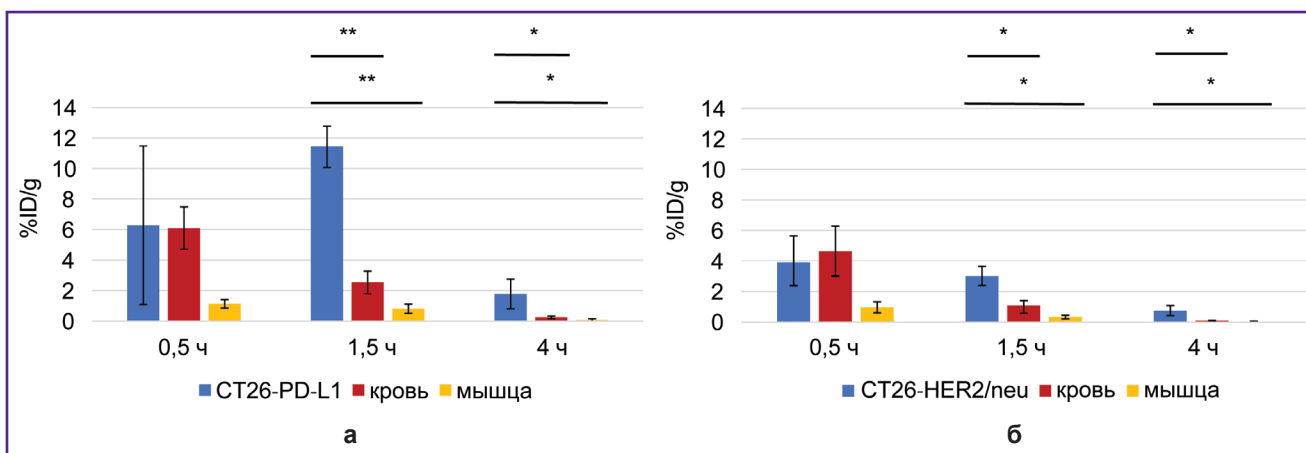
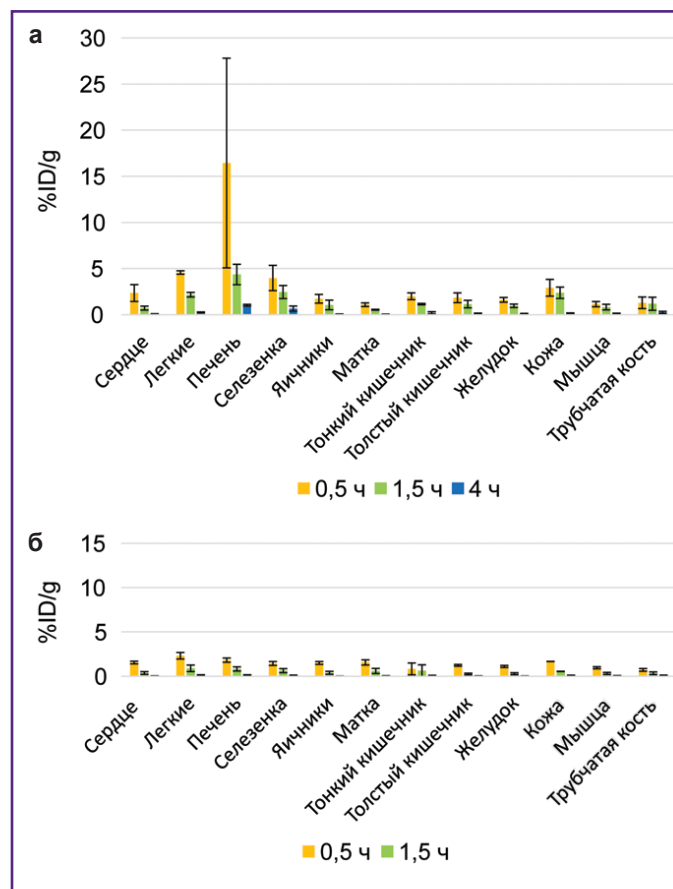


Рис. 6. Изменение радиоактивности специфической опухоли, крови и мышечной ткани после введения радиоиммуноконъюгатов:
 а — ^{68}Ga -VНН PD-L1; б — ^{68}Ga -VНН HER2/neu. По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $m \pm \sigma$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Исследование биораспределения в организме мышей РИК, содержащих ^{177}Lu , проводили в течение 96 ч после введения, что обусловлено временем полураспада этого изотопа. После введения ^{177}Lu -VНН PD-L1 или ^{177}Lu -VНН HER2/neu также происходило быстрое снижение радиоактивности крови: через 4 ч ее значение не превышало 0,25% (см. рис. 6). Это

было следствием того, что после введения данных РИК радионуклиды также интенсивно выводились с мочой, при этом значительная их часть задерживалась в почках, где накопление радиоактивности было наибольшим по сравнению с другими органами и тканями (рис. 7 и 8). Радиоактивность специфической опухоли была сопоставима (для ^{177}Lu -VНН HER2/

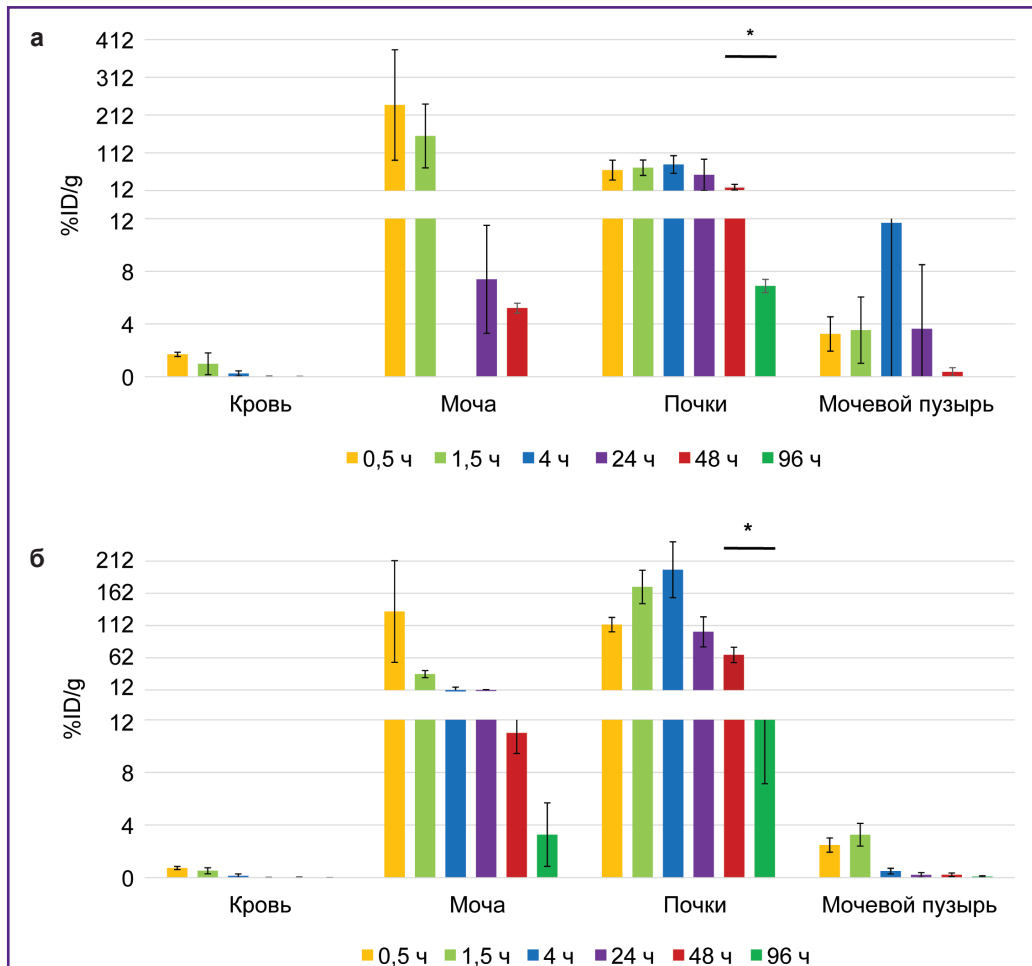


Рис. 7. Изменение радиоактивности крови, мочи, почек и мочевого пузыря после введения радиоиммуноконъюгатов:

а — ^{177}Lu -VNH PD-L1; **б** — ^{177}Lu -VNH HER2/neu. По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $m \pm \sigma$; * $p < 0,05$

neu) или меньше (^{177}Lu -VNH HER2/neu), чем радиоактивность легких, печени и селезенки, но больше, чем остальных органов и тканей, исключая почки (см. рис. 8; рис. 9).

В течение 48 ч после введения ^{177}Lu -VNH PD-L1 или ^{177}Lu -VNH HER2/neu радиоактивность специфической опухоли превышала радиоактивность контрольной опухоли (см. рис. 9). Эти данные демонстрируют, что ^{177}Lu -VNH PD-L1 и ^{177}Lu -VNH HER2/neu также специфично связываются *in vivo* с опухолью, экспрессирующей целевой биомаркер. Накопление радиоактивности в специфической опухоли достигало максимума через 4 ч: в среднем 6,6% для ^{177}Lu -VNH PD-L1 и 2,3% для ^{177}Lu -VNH HER2/neu. Далее радиоактивность специфической опухоли медленно снижалась, что может обеспечить длительное терапевтическое воздействие.

На рис. 10 показано соотношение площадей под кривой для графиков радиоактивности специфиче-

ской и контрольной опухолей, а также крови в течение 96 ч после введения ^{177}Lu -VNH PD-L1 и ^{177}Lu -VNH HER2/neu. Отношения этих площадей для специфической и контрольной опухоли составили 19,8 после введения ^{177}Lu -VNH PD-L1 и 15,6 после введения ^{177}Lu -VNH HER2/neu (см. таблицу). Такие высокие значения подтверждают селективность связывания РИК со специфической опухолью. Отношения таких площадей для специфической опухоли и крови были соответственно 38,9 и 25,5. Это значит, что применение РИК для терапии не должно приводить к значительному радиационному воздействию на организм.

В настоящей работе исследована зависимость биораспределения РИК не только от входящих в их состав наноантител, но и от радионуклидов, так как в литературе мы не нашли данные по сравнению биораспределения РИК, содержащих одни и те же наноантитела, с этими радионуклидами. Проведено сравнение радиоактивности органов и тканей

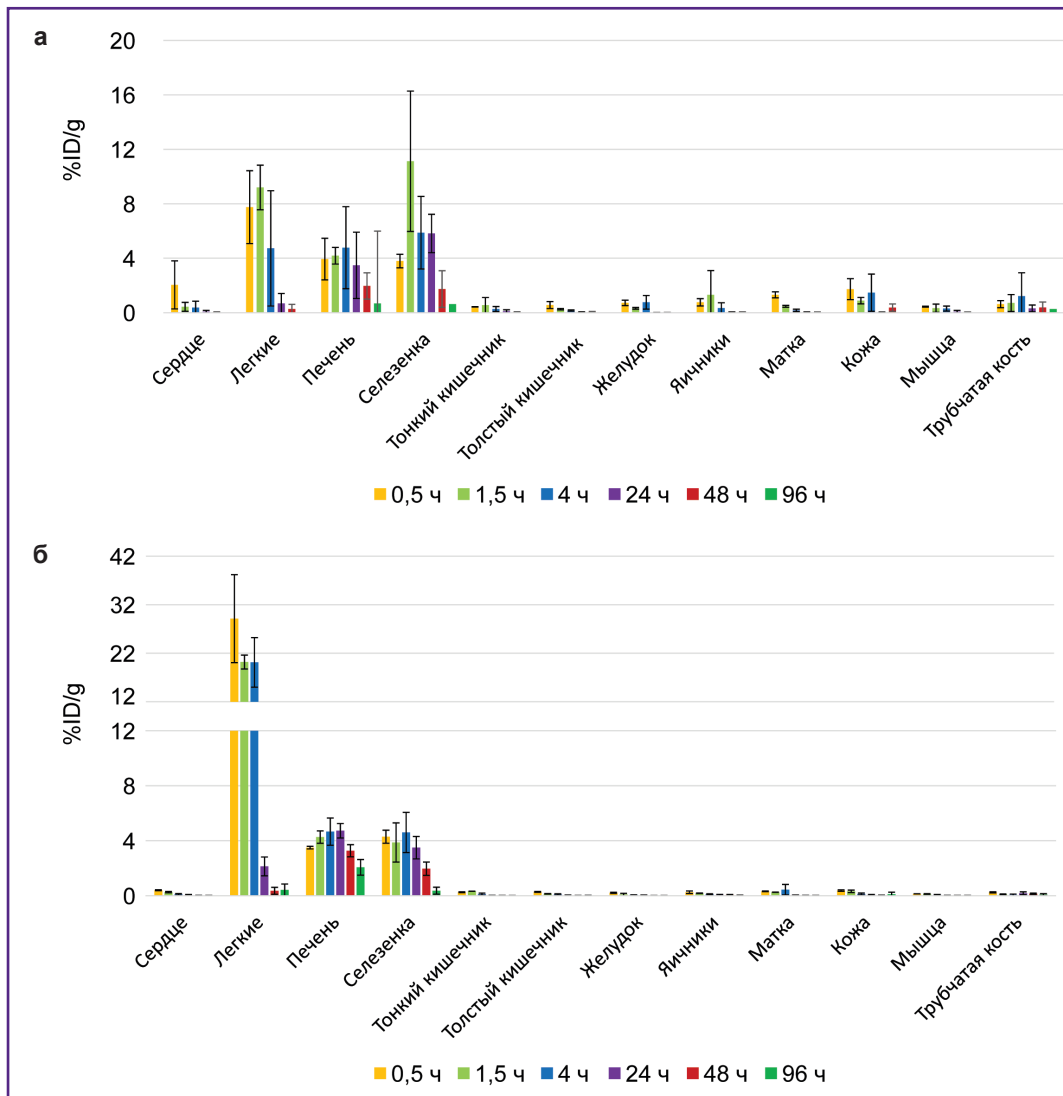


Рис. 8. Динамика биораспределения радиоиммуноконъюгатов в организме мышей: а — ¹⁷⁷Lu-VNH PD-L1; б — ¹⁷⁷Lu-VNH HER2/neu. По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $\pm\sigma$

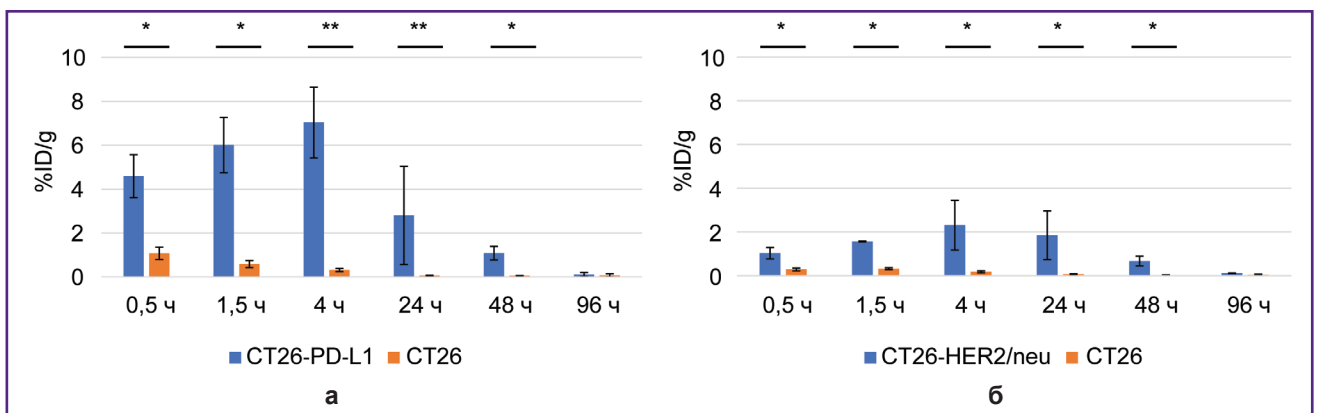


Рис. 9. Сравнение динамики радиоактивностей специфической опухоли CT26-PD-L1 или CT26-HER2/neu и контрольной опухоли CT26 после введения радиоиммуноконъюгатов: а — ¹⁷⁷Lu-VNH PD-L1; б — ¹⁷⁷Lu-VNH HER2/neu. По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $\pm\sigma$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

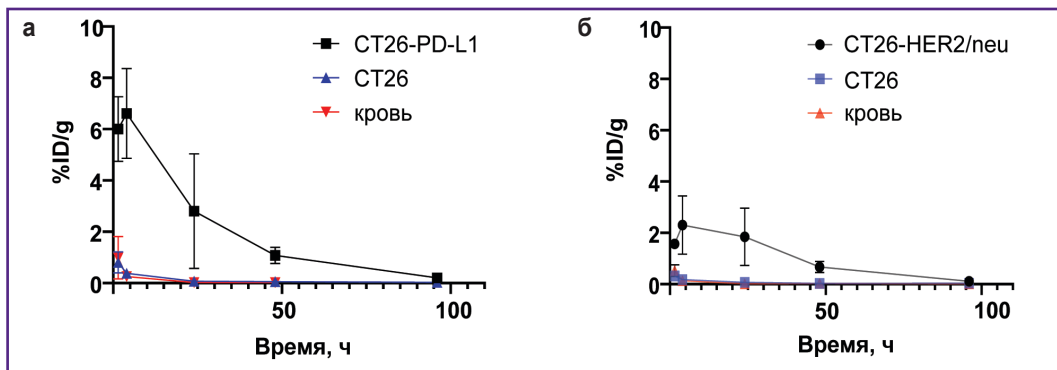


Рис. 10. Графики зависимости радиоактивности специфической и контрольной опухолей и крови от времени после введения радиоиммуноконъюгатов: а — $^{177}\text{Lu-VNH PD-L1}$; б — $^{177}\text{Lu-VNH HER2/neu}$

Площади под кривой (ППК, %ID/g-h) графиков зависимости радиоактивности от времени после введения радиоиммуноконъюгатов ($m \pm \sigma$) и отношения ППК специфической и контрольной опухолей, а также специфической опухоли и крови

$^{177}\text{Lu-VNH PD-L1}$		$^{177}\text{Lu-VNH HER2/neu}$	
ППК0-96 CT26-PD-L1	187,3±12,4	ППК0-96 HER2/neu	95,3±9,7
ППК0-96 CT26	9,4±0,8	ППК0-96 CT26	6,1±0,5
ППК0-96 кровь	4,7±0,4	ППК0-96 кровь	3,7±0,3
ППК0-96 CT26-PD-L1/ ППК0-96 CT26	19,8	ППК0-96 CT26-HER2/neu/ ППК0-96 CT26	15,6
ППК0-96 CT26-PD-L1/ ППК0-96 кровь	38,9	ППК0-96 CT26-HER2/neu/ ППК0-96 кровь	25,5

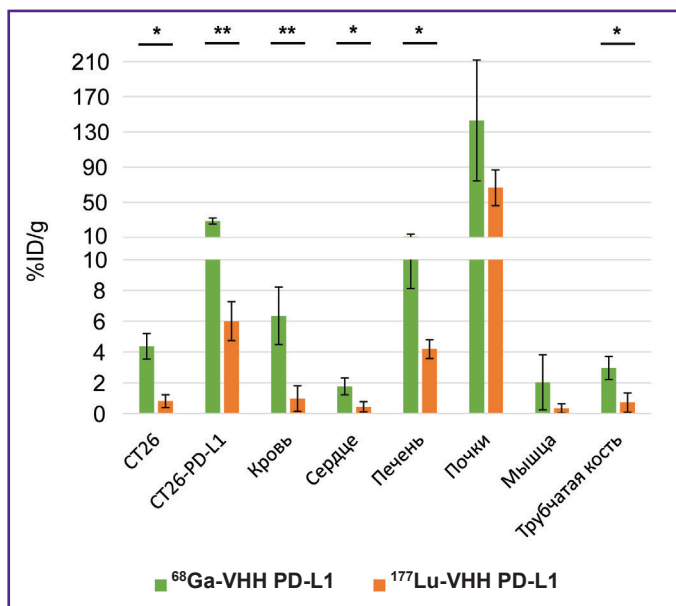


Рис. 11. Биораспределение $^{68}\text{Ga-VNH PD-L1}$ и $^{177}\text{Lu-VNH PD-L1}$ через 1,5 ч после введения. По оси ординат — радиоактивность 1 г ткани, доля в процентах от введенной радиоактивности. Результаты представлены в виде $m \pm \sigma$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

мышей через 1,5 ч после введения $^{68}\text{Ga-VNH PD-L1}$ и $^{177}\text{Lu-VNH PD-L1}$. Для того чтобы провести такое сравнение, был учтен быстрый распад ^{68}Ga путем нормализации радиоактивности на время введения. Показано, что в специфической и неспецифической опухолях, крови, сердце и печени накопление нано-

антител, меченных ^{68}Ga , кратно превышает накопление наноантител, меченных ^{177}Lu (рис. 11). Важно: эти препараты были изготовлены на основе одного наноантитела и имели один хелатирующий агент DOTA, что уменьшает варианты интерпретаций полученных результатов.

Обсуждение

Основная цель работы заключалась в том, чтобы продемонстрировать возможность использования пар РИК наноантител с радиоизотопами для терапии опухолей, экспрессирующих биомаркеры PD-L1 и HER2/neu. Наноантитела были конъюгированы с ^{68}Ga , используемым в диагностических целях, и с ^{177}Lu , применяемым для терапии опухолей. Результаты показали наличие специфического связывания всех РИК с опухолями, экспрессирующими PD-L1 или HER2/neu соответственно. Показано также, что после введения этих РИК в кровоток происходит интенсивное выведение радионуклидов ^{68}Ga и ^{177}Lu через мочевыделительную систему. Это обусловлено тем, что молекулярная масса белковых молекул в РИК меньше пороговой массы, равной 65 кДа. Благодаря этому данные молекулы могут проходить через почечный барьер и выводиться с мочой [28, 29]. В результате наблюдается быстрое падение радиоактивности органов и тканей. Известно, что фрагменты антител, включая V_HN, удаляются из крови гораздо быстрее, чем целые моноклональные антитела, период полувыведения которых составляет несколько суток из-за большой молекулярной массы (150 кДа) и обусловленной этим невозможности пройти через почечный фильтр из крови в первичную мочу [30–32]. Еще одним преимуществом РИК на основе наноантител и других низкомолекулярных векторных молекул является отсутствие Fc-фрагмента. Этот фрагмент целых моноклональных антител связывается в организме с неонатальным рецептором Fc-фрагмента (FcRn), экспрессируемым клетками организма, включая эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, что препятствует деградации моноклональных антител в лизосомах после эндоцитоза, приводит к их рециркуляции обратно к клеточной поверхности и, соответственно, к задержке в крови [33, 34]. Кроме того, у таких РИК нет обусловленных данным фрагментом эффекторных функций, которые необходимы для функционирования иммунной системы, но в ряде случаев могут быть нежелательны для радиофармпрепаратов [35, 36].

Более низкий молекулярный вес наноантител и других векторных молекул обуславливает еще одну особенность их фармакокинетики по сравнению с целыми антителами. Помимо интенсивного выведения из организма с мочой V_HN и другие фрагменты быстрее и равномернее проникают в ткань специфической опухоли [37]. Благодаря сочетанию этих свойств происходит быстрое и значительное превышение радиоактивности опухоли, экспрессирующей целевые биомаркеры, над радиоактивностью крови и мышечной ткани. Это делает возможным использование РИК с короткоживущими изотопами, такими как ^{68}Ga , для контрастной визуализации опухолей. Быстрое выведение радионуклидов из

кровотока также приводит к снижению радиационной нагрузки при терапии опухолевых заболеваний. Исследованные ранее радиоконъюгаты, созданные на основе небольших каркасных белков и фрагментов антител, быстрее выводились из крови и больше накапливались в почках по сравнению с целыми антителами [18–22].

Одной из проблем при использовании РИК на основе наноантител является относительно высокая скорость выведения радионуклидов из специфической опухоли: через 96 ч после введения таких РИК, содержащих ^{177}Lu , радиоактивность опухоли была крайне мала (см. рис. 9). Это является следствием быстрого выведения РИК из крови, в результате чего только небольшая часть меченых наноантител достигает цели. Для достижения высокой целевой радиационной нагрузки РИК можно вводить несколько раз [38]. Другой проблемой является накопление радиоактивности в почках. Выведение РИК на основе наноантител через мочевыделительную систему приводит к значительной радиоактивности этих органов, вероятно из-за того, что металл-хелатные комплексы задерживаются в лизосомах эпителиальных клеток почечных канальцев при реабсорбции из первичной мочи [28]. Это в первую очередь актуально для РИК, содержащих радионуклиды, используемые в терапевтических целях, чье излучение скорее способно повредить ткани организма, чем излучение радионуклидов, применяемых для диагностики. В настоящее время в клинике для снижения радиоактивности в почках вместе с некоторыми радиофармпрепаратами вводят аргинин и лизин в качестве сопутствующих веществ. Конкурируя с радиофармпрепаратом за сайты связывания, используемые при реабсорбции, эти вещества уменьшают накопление радиоактивности в почках. Исследуют и другие подходы для решения этой проблемы, в том числе предварительное нацеливание, присоединение альбуминсвязывающего домена, использование расщепляющихся линкеров [39–41].

Представленные результаты показывают возможность применения пар РИК ^{68}Ga -V_HN PD-L1 и ^{177}Lu -V_HN PD-L1, ^{68}Ga -V_HN HER2/neu и ^{177}Lu -V_HN HER2/neu для терапии опухолей, экспрессирующих PD-L1 и HER2/neu. В каждой паре РИК различались только радионуклидами, но не векторными молекулами и хелатирующими агентами. Использование таких пар облегчит, как уже было отмечено, стандартизацию изготовления РИК, упростит логистику лечебного процесса и снизит его стоимость. Ранее проведенные исследования [23, 42–45] конъюгатов радионуклидов с иммунными векторными молекулами, специфичными к PD-L1 или HER2/neu, не предусматривали подобного подхода.

В отличие от уже широко используемых для терапии радиоконъюгатов на основе пептидов и других низкомолекулярных лигандов наноантитела могут иметь селективность к любым эпитопам.

Соответственно, можно ожидать получения на основе наноантител новых тераностических пар РИК, специфичных к другим биомаркерам. Кроме того, РИК могут содержать другие изотопы, предназначенные для диагностики или терапии. Радионуклиды различаются по излучению, периоду полураспада и токсичности, что дает возможность подобрать нужный изотоп при разработке радиофармпрепарата, предназначенного для решения конкретной задачи. Таким образом, возникает необходимость исследовать и сравнивать большое количество РИК, различающихся векторными молекулами и/или радионуклидами. Это делает актуальным использование в доклинических исследованиях стандартизированных, охарактеризованных, воспроизводимых и желательных недорогих экспериментальных моделей. Такими моделями являются генно-инженерные клетки, созданные на основе опухолевых клеток мышей и несущие биомаркеры опухолей человека, которые могут быть привиты мышам с минимально модифицированной или интактной иммунной системой [27, 46, 47]. Как было отмечено, в данной работе для образования опухолей мышам прививали гуманизированные клетки CT26-PD-L1 и CT26-HER2/neu, созданные на основе мышинных клеток CT26 и экспрессирующие соответственно PD-L1 и HER2/neu человека.

Интересным и неожиданным наблюдением является зависимость биораспределения исследованных РИК в органах и тканях не только от входящих в их состав наноантител, но и от радионуклидов. Показано, что в ряде органов и тканей, включая опухоли, накопление наноантител, меченных ^{68}Ga ,кратно превышает накопление таких же наноантител, меченных ^{177}Lu . Известно, что биораспределение радиофармпрепаратов, содержащих радиоактивные изотопы металлов и галогенов, различно, поскольку галогены меньше задерживаются в почках [28]. Нами была получена существенная разница в биораспределении РИК, содержащих изотопы разных металлов.

Заключение

Показана функциональная пригодность пар РИК наноантител с радиоизотопами ^{68}Ga и ^{177}Lu для диагностики и терапии опухолей, экспрессирующих биомаркеры PD-L1 и HER2/neu. Каждая пара РИК с одинаковой специфичностью была синтезирована с использованием одной и той же векторной молекулы и одного и того же хелатирующего агента. Это дает возможность повысить надежность лечения и снизить его стоимость. Создание подобных тераностических пар радиофармпрепаратов на основе фрагментов моноклональных антител может открыть большие возможности для эффективного персонализированного лечения онкологических заболеваний.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ, рег. №122040800129-5.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Duan H., Iagaru A., Aparici C.M. Radiotheranostics — precision medicine in nuclear medicine and molecular imaging. *Nanotheranostics* 2022; 6(1): 103–117, <https://doi.org/10.7150/ntno.64141>.
2. Burkett B.J., Bartlett D.J., McGarrah P.W., Lewis A.R., Johnson D.R., Berberoğlu K., Pandey M.K., Packard A.T., Halfdanarson T.R., Hruska C.B., Johnson G.B., Kendi A.T. A review of theranostics: perspectives on emerging approaches and clinical advancements. *Radiol Imaging Cancer* 2023; 5(4): e220157, <https://doi.org/10.1148/rycan.220157>.
3. Strosberg J., El-Haddad G., Wolin E., Hendifar A., Yao J., Chasen B., Mittra E., Kunz P.L., Kulke M.H., Jacene H., Bushnell D., O'Dorisio T.M., Baum R.P., Kulkarni H.R., Caplin M., Lebtahi R., Hobbday T., Delpassand E., Van Cutsem E., Benson A., Srirajakanthan R., Pavel M., Mora J., Berlin J., Grande E., Reed N., Seregni E., Öberg K., Lopera Sierra M., Santoro P., Thevenet T., Erion J.L., Ruzsiewicz P., Kwekkeboom D., Krenning E.; NETTER-1 Trial Investigators. Phase 3 trial of ^{177}Lu -Dotatate for midgut neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2017; 376(2): 125–135, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607427>.
4. Chi K.N., Yip S.M., Bauman G., Probst S., Emmenegger U., Kollmannsberger C.K., Martineau P., Niazi T., Pouliot F., Rendon R., Hotte S.J., Laidley D.T., Saad F. ^{177}Lu -PSMA-617 in metastatic castration-resistant prostate cancer: a review of the evidence and implications for Canadian clinical practice. *Curr Oncol* 2024; 31(3): 1400–1415, <https://doi.org/10.3390/curroncol31030106>.
5. Guleria I., Khosroshahi A., Ansari M.J., Habicht A., Azuma M., Yagita H., Noelle R.J., Coyle A., Mellor A.L., Khoury S.J., Sayegh M.H. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med* 2005; 202(2): 231–237, <https://doi.org/10.1084/jem.20050019>.
6. Brown J.A., Dorfman D.M., Ma F.R., Sullivan E.L., Munoz O., Wood C.R., Greenfield E.A., Freeman G.J. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003; 170(3): 1257–1266, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1257>.
7. Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y., Okazaki T., Honjo T., Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(19): 12293–12297, <https://doi.org/10.1073/pnas.192461099>.
8. Lin X., Kang K., Chen P., Zeng Z., Li G., Xiong W., Yi M., Xiang B. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers. *Mol Cancer* 2024; 23(1): 108, <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02023-w>.
9. Dong H., Strome S.E., Salomao D.R., Tamura H., Hirano F., Flies D.B., Roche P.C., Lu J., Zhu G., Tamada K.,

- Lennon V.A., Celis E., Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8(8): 793–800, <https://doi.org/10.1038/nm730>.
10. Cheng X. A comprehensive review of HER2 in cancer biology and therapeutics. *Genes (Basel)* 2024; 15(7): 903, <https://doi.org/10.3390/genes15070903>.
11. Trenker R., Diwanji D., Bingham T., Verba K.A., Jura N. Structural dynamics of the active HER4 and HER2/HER4 complexes is finely tuned by different growth factors and glycosylation. *Elife* 2024; 12: RP92873, <https://doi.org/10.7554/eLife.92873>.
12. Dvir K., Giordano S., Leone J.P. Immunotherapy in breast cancer. *Int J Mol Sci* 2024; 25(14): 7517, <https://doi.org/10.3390/ijms25147517>.
13. Pruszynski M., Leszczuk E., Radchenko V., John K., Bruchertseifer F., Morgenstern A., D'huyvetter M., Lahoutte T. Anti-HER2 nanobody labeled with ²²⁵Ac as a potential radiopharmaceutical for TRT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016; 43(Suppl 1): S177.
14. 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, <https://doi.org/10.3390/ijms24065994>.
15. Manning D., Santana L.F. Regulating voltage-gated ion channels with nanobodies. *Nat Commun* 2022; 13(1): 7557, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35027-5>.
16. 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., Xavier C. Anti-human PD-L1 nanobody for immuno-PET imaging: validation of a conjugation strategy for clinical translation. *Biomolecules* 2020; 10(10): 1388, <https://doi.org/10.3390/biom10101388>.
17. Zhao L., Gong J., Liao S., Huang W., Zhao J., Xing Y. Preclinical evaluation and preliminary clinical study of ⁶⁸Ga-NODAGA-NM-01 for PET imaging of PD-L1 expression. *Cancer Imaging* 2025; 25(1): 6, <https://doi.org/10.1186/s40644-025-00826-8>.
18. Vosjan M.J., Perk L.R., Roovers R.C., Visser G.W., Stigter-van Walsum M., van Bergen En Henegouwen P.M., van Dongen G.A. Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with ⁶⁸Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38(4): 753–763, <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1700-1>.
19. 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 Immunother Cancer* 2020; 8(2): e001156, <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001156>.
20. 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 ¹⁷⁷Lu-labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics* 2014; 4(7): 708–720, <https://doi.org/10.7150/thno.8156>.
21. Keyaerts M., Xavier C., Heemskerk J., Devoogdt N., Everaert H., Ackaert C., Vanhoeij M., Duhoux F.P., Gevaert T., Simon P., Schallier D., Fontaine C., Vaneycken I., Vanhove C., De Greve J., Lamote J., Caveliers V., Lahoutte T. Phase I study of ⁶⁸Ga-HER2-nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma. *J Nucl Med* 2016; 57(1): 27–33, <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.162024>.
22. Gondry O., Caveliers V., Xavier C., Raes L., Vanhoeij M., Verfaillie G., Fontaine C., Glorieus K., De Grève J., Joris S., Luyten I., Zwaenepoel K., Vandembroucke F., Waelput W., Thyparambil S., Vaneycken I., Cousaert J., Bourgeois S., Devoogdt N., Goethals L., Everaert H., De Geeter F., Lahoutte T., Keyaerts M. Phase II trial assessing the repeatability and tumor uptake of [⁶⁸Ga]Ga-HER2 single-domain antibody PET/CT in patients with breast carcinoma. *J Nucl Med* 2024; 65(2): 178–184, <https://doi.org/10.2967/jnumed.123.266254>.
23. D'Huyvetter M., Vos J., Caveliers V., Vaneycken I., Heemskerk J., Duhoux F.P., Fontaine C., Vanhoeij M., Windhorst A.D., Aa F.V., Hendrikse N.H., Eersels J.L.E., Everaert H., Gykiere P., Devoogdt N., Raes G., Lahoutte T., Keyaerts M. Phase I trial of ¹³¹I-GMIB-anti-HER2-VHH1, a new promising candidate for HER2-targeted radionuclide therapy in breast cancer patients. *J Nucl Med* 2021; 62(8): 1097–1105, <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.255679>.
24. Shetty D., Lee Y.S., Jeong J.M. (68)Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography. *Nucl Med Mol Imaging* 2010; 44(4): 233–240, <https://doi.org/10.1007/s13139-010-0056-6>.
25. Niu T., Fan M., Lin B., Gao F., Tan B., Du X. Current clinical application of lutetium-177 in solid tumors (review). *Exp Ther Med* 2024; 27(5): 225, <https://doi.org/10.3892/etm.2024.12514>.
26. Avrov K.O., Shatik S.V., Zaitsev V.V., Al-Shehadat R.I., Shashkova O.A., Terekhina L.A., Malakhov I.S., Samoylovich M.P. Application of magnetic particles for fast determination of immunoreactive fraction of ⁶⁸Ga-labelled VHH antibodies to PD-L1. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(3): 26–33, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.3.03>.
27. Shashkova O.A., Terekhina L.A., Malakhov I.S., Pinevich A.A., Vartanyan N.L., Avrov K.O., Krutetskaya I.Yu., Gryazeva I.V., Berlina M.A., Stolbovaya A.Yu., Smirnov I.V., Fedorenko S.V., Krylova A.A., Nadporojskii M.A., Shatik S.V., Stanzhevskii A.A., Samoilovich M.P. Cell model for testing pharmaceuticals targeting human PD-L1. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(5): 5, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.5.01>.
28. Chigoho D.M., Bridoux J., Hernot S. Reducing the renal retention of low- to moderate-molecular-weight radiopharmaceuticals. *Curr Opin Chem Biol* 2021; 63: 219–228, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.06.008>.
29. 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): 1049–1058, <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.075101>.
30. Allen K.J.H., Jiao R., Malo M.E., Frank C., Dadachova E. Biodistribution of a radiolabeled

antibody in mice as an approach to evaluating antibody pharmacokinetics. *Pharmaceutics* 2018; 10(4): 262, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040262>.

31. Rasaneh S., Rajabi H., Babaei M.H., Johari Daha F. Synthesis and biodistribution studies of ¹⁷⁷Lu-trastuzumab as a therapeutic agent in the breast cancer mice model. *J Label Compd Radiopharm* 2010; 53(9): 575–579, <https://doi.org/10.1002/jlcr.1780>.

32. Glatt D.M., Beckford Vera D.R., Parrott M.C., Luft J.C., Benhabbour S.R., Mumper R.J. The interplay of antigen affinity, internalization, and pharmacokinetics on CD44-positive tumor targeting of monoclonal antibodies. *Mol Pharm* 2016; 13(6): 1894–1903, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00063>.

33. Vivier D., Sharma S.K., Zeglis B.M. Understanding the in vivo fate of radioimmunoconjugates for nuclear imaging. *J Labelled Comp Radiopharm* 2018; 61(9): 672–692, <https://doi.org/10.1002/jlcr.3628>.

34. Roopenian D.C., Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(9): 715–725, <https://doi.org/10.1038/nri2155>.

35. Bournazos S., Gupta A., Ravetch J.V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat Rev Immunol* 2020; 20(10): 633–643, <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>.

36. Rodriguez C., Sarrett S.M., Sebastiano J., Delaney S., McGlone S.A., Hosny M.M., Thau S., Bournazos S., Zeglis B.M. Exploring the interplay between radioimmunoconjugates and Fcγ receptors in genetically engineered mouse models of cancer. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2024; 7(11): 3452–3461, <https://doi.org/10.1021/acsptsci.4c00275>.

37. Fu R., Carroll L., Yahioğlu G., Aboagye E.O., Miller P.W. Antibody fragment and affibody immunoPET imaging agents: radiolabelling strategies and applications. *ChemMedChem* 2018; 13(23): 2466–2478, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800624>.

38. Altunay B., Morgenroth A., Beheshti M., Vogt A., Wong N.C.L., Ting H.H., Biersack H.J., Stickeler E., Mottaghy F.M. HER2-directed antibodies, affibodies and nanobodies as drug-delivery vehicles in breast cancer with a specific focus on radioimmunotherapy and radioimmunomaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021; 48(5): 1371–1389, <https://doi.org/10.1007/s00259-020-05094-1>.

39. Long X., Cheng S., Lan X., Wei W., Jiang D. Trends in nanobody radiotheranostics. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2025; 52(6): 2225–2238, <https://doi.org/10.1007/s00259-025-07077-6>.

40. Molitoris B.A., Sandoval R.M., Yadav S.P.S., Wagner M.C. Albumin uptake and processing by the proximal tubule: physiological, pathological, and therapeutic implications. *Physiol Rev* 2022; 102(4): 1625–1667, <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2021>.

41. Bendre S., Zhang Z., Kuo H.T., Rousseau J., Zhang C., Merkens H., Roxin Á., Bénard F., Lin K.S. Evaluation of Met-Val-Lys as a renal brush border enzyme-cleavable linker to reduce kidney uptake of ⁶⁸Ga-labeled DOTA-conjugated peptides and peptidomimetics. *Molecules* 2020; 25(17): 3854, <https://doi.org/10.3390/molecules25173854>.

42. Wang X., Teng F., Kong L., Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 5023–5039, <https://doi.org/10.2147/OTT.S105862>.

43. Zanello A., Bortolotti M., Maiello S., Bolognesi A., Polito L. Anti-PD-L1 immunoconjugates for cancer therapy: are available antibodies good carriers for toxic payload delivering? *Front Pharmacol* 2022; 13: 972046, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.972046>.

44. Luna-Gutiérrez M., Azorín-Vega E., Oros-Pantoja R., Ocampo-García B., Cruz-Nova P., Jiménez-Mancilla N., Bravo-Villegas G., Santos-Cuevas C., Meléndez-Alafort L., Ferro-Flores G. Lutetium-177 labeled iPD-L1 as a novel immunomodulator for cancer-targeted radiotherapy. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2025; 10(1): 5, <https://doi.org/10.1186/s41181-025-00328-9>.

45. Elster N., Collins D.M., Toomey S., Crown J., Eustace A.J., Hennessy B.T. HER2-family signalling mechanisms, clinical implications and targeting in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 149(1): 5–15, <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3250-x>.

46. Ertveldt T., De Beck L., De Ridder K., Locy H., de Mey W., Goyvaerts C., Lecocq Q., Ceuppens H., De Vlaeminck Y., Awad R.M., Keyaerts M., Devoogdt N., D'Huyvetter M., Breckpot K., Krasniqi A. Targeted radionuclide therapy with low and high-dose lutetium-177-labeled single domain antibodies induces distinct immune signatures in a mouse melanoma model. *Mol Cancer Ther* 2022; 21(7): 1136–1148, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0791>.

47. Nilofar Danishmalik S., Lee S.H., Sin J.I. Tumor regression is mediated via the induction of HER263-71-specific CD8+ CTL activity in a 4T1.2/HER2 tumor model: no involvement of CD80 in tumor control. *Oncotarget* 2017; 8(16): 26771–26788, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15816>.