

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА [²¹²Pb]DOTATATE ДЛЯ ТЕРАПИИ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ

К.В. Коков^{1,2}, А.Г. Демченко³, Б.В. Егорова⁴, А.А. Ларкин¹, А.В. Ляндун³,
К.А. Маковеева¹, А.Н. Мусеева¹, В.Я. Панченко^{1,2}, М.А. Прошин¹,
И.В. Решетов^{1,3}, Д.Ю. Чувилін^{1,2}

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва

² Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

³ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва,

⁴ Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Разработана методика получения прототипа радиофармацевтического лекарственного препарата [²¹²Pb]DOTATATE для исследований в области радионуклидной терапии нейроэндокринных опухолей. Разработан лабораторный генератор β-излучающего радионуклида ²¹²Pb с эффективностью работы 40 %. Для определения цитотоксического действия комплекса [²¹²Pb]DOTATATE экспрессирующие рецепторы соматостатина клетки рака поджелудочной железы (клеточная линия Rin-m5F) были инкубированы с [²¹²Pb]DOTATATE; выживаемость клеток определялась с использованием анализа по Presto Blue.

Ключевые слова: радиофармпрепарат, нейроэндокринные опухоли, ядерная медицина, производство радионуклидов, цитотоксичность

Введение

Адресное воздействие на опухолевые ткани – важнейшая проблема современной фундаментальной и практической онкологии. Суть метода таргетной терапии состоит в доставке токсичных препаратов к раковым клеткам с помощью искусственно созданных биохимических комплексов (биокоњуговатов), обладающих способностью избирательно соединяться с поверхностными рецепторами на раковой клетке, одновременно с чем клетки здоровых тканей остаются незатронутыми.

Одним из методов таргетной терапии является так называемая пептидно-рецепторная радионуклидная терапия (ПРРТ), суть которой состоит в повреждении раковой клетки с помощью короткоживущих α-излучающих радионуклидов (α-эмиттеров), состоящих в комплексе с синтетическими пептидами, специфичными к рецепторам ряда опухолей, называемых нейроэндокринными [1, 2]. В качестве α-эмиттеров в таргетной терапии могут использоваться ¹⁴⁹Tb ($T_{1/2}=4,12$ ч), ²¹²Pb ($T_{1/2}=60$ мин), ²¹³Bi ($T_{1/2}=46$ мин), ²²⁵Ac

($T_{1/2}=10$ сут) и некоторые другие [3–6]. α -частицы обладают высокой энергией (5–8 МэВ) и коротким пробегом в тканях (10–100 мкм), поэтому при локализации достаточного количества ионов α -эмиттера в непосредственной близости от опухолевой клетки достигается избирательное уничтожение злокачественных новообразований при минимальном повреждении окружающих тканей. В качестве биологических молекул для доставки препарата избирательно к тканям опухоли могут использоваться комплексы, имеющие в своем составе, во-первых, синтетические пептиды или моноклональные антитела [7, 8], специфичные к определенному опухолевому антигену, и, во-вторых, хелатирующие агенты, которые способны связывать с собой валентные ионы радионуклидов. Разработка таргетных препаратов для радионуклидной терапии, меченных различными альфа-эмиттерами, проводится с конца 1980-х годов, и по настоящее время продолжается все с большей динамикой [9, 10].

Использование короткоживущих радионуклидов при получении терапевтических комплексов имеет свои особенности. Для эффективного использования радионуклидов за измеримое с их периодом полураспада время радионуклиды необходимо произвести, провести комплексообразование с биоконъюгатом, выполнить контроль основных параметров и отобрать препарат в количествах, необходимых для введения пациенту. Решить эту задачу можно двумя путями:

- ✓ созданием автоматизированного модуля синтеза радиофармпрепарата, который непосредственно в лечебном учреждении с минимальными временными затратами будет проводить все необходимые операции по обеспечению медицинского персонала синтезированным препаратом;
- ✓ использованием *in vivo* генераторов, что предполагает применение при мечении биоконъюгатов таких радионуклидов, которые генерируют нужный дочерний нуклид после введения пациенту внутри его тела. Для терапевтического α - β -излучающего ^{212}Bi таким является β -эмиттер ^{212}Pb ($T_{1/2}$ 10,64 ч) [11, 12]. ^{212}Pb представляет особый интерес, поскольку его дочерние нуклиды (^{212}Bi и ^{212}Po) подвергаются α -распаду, благодаря чему ^{212}Pb может рассматриваться как *in vivo* генератор альфа-частиц. Радионуклид ^{212}Pb принадлежит радиоактивному ряду долгоживу-

щего материнского ^{228}Th ($T_{1/2}$ 1,9 г) и поэтому может быть получен при помощи лабораторных генераторов.

Цель настоящей работы заключалась в наработке терапевтического радионуклида ^{212}Pb на разработанном лабораторном генераторе, синтезе комплекса [^{212}Pb]DOTATATE высокой молярной активности, а также в исследовании цитотоксического эффекта синтезированного прототипа радиофармпрепарата. Синтез и исследование диссоциативной устойчивости в физиологических средах препарата низкой молярной активности проводились ранее [13]. Эффективность включения валентных ионов металла в хелатор, входящий в состав биоконъюгата (радиохимический выход реакции мечения) зависит от таких параметров, как pH реакционной смеси, чистота используемых реактивов, температура, время проведения реакции (инкубация) и др. В данной работе выход реакции мечения определялся методом инстантной тонкослойной хроматографии (iTLC).

Материал и методы

В связи с тем, что в цепочке распада родительского ^{228}Th на каждом этапе вплоть до образования ^{212}Pb все промежуточные компоненты являются α -излучающими частицами (см. табл. 1), для радионуклидной чистоты наработанного образца использовался альфа-спектрометрический метод анализа. Радионуклидная чистота продукта является ключевым параметром применительно к ядерной медицине, предполагается в пределах допустимого отсутствие попадания в организм пациента долгоживущих материнских радионуклидов.

Таблица 1

Альфа-эмиттеры в ряду распада ^{228}Th

Нуклид	Период полураспада	Энергия α -частиц, кэВ (радиационный выход, %)
^{228}Th	1,9116 лет	5340,36 (27,2) 5423,15 (72,2)
^{224}Ra	3,66 сут	5448,60 (5,06) 5685,37 (94,92)
^{220}Rn	55,6 с	6288,08 (99,886)
^{216}Po	0,145 с	6778,30 (99,9981)
^{212}Bi	60,55 мин	6050,78 (69,91) 6089,88 (27,12)
^{212}Po	0,299 мкс	8784,37 (100)

Биоконъюгат DOTATATE был любезно предоставлен ЗАО “Синтез пептидов” (М.В. Овчинников, Москва). Он представляет собой комплекс из синтетического октапептида октреотата, специфичного к рецепторам соматостатина типа SSTR2 [14], с присоединенным хелатирующим агентом, способным образовывать прочные координационные связи с большим количеством катионов (Fe, Zn, Co, Cu, Y, In, As, Bi и др.). В качестве такого хелатора была использована DOTA (1,4,7,10-тетраазоциклододекан-N,N',N'',N'''-тетраакусная кислота).

В качестве неподвижной фазы в iTLC служили пластины из стеклянной микрофибры с покрытием из силикагеля. В качестве подвижной фазы был выбран раствор 0,1 М цитрата натрия (рН 4,4). В этом случае комплекс пептида с радионуклидом оставался на старте, а “свободный” ^{212}Pb продвигался с фронтом растворителя [15]. В пробирку 50 мл пипетировали 2 мл подвижной фазы. Пластины разделялись на полосы размером 1,5×12 см, каждая из которых маркировалась на расстоянии 1,5 см от одного из краев пластины для обозначения старта. На старт пластины пипетировалось 6 мкл исследуемого раствора, после чего она помещалась в пробирку с элюентом так, что край пластины опускался на ~2 мм в элюент, с тем чтобы пятно от образца оставалось выше уровня элюента. После достижения элюентом верхнего края пластины она подвергалась высушиванию в вытяжном шкафу в течение 10 мин. Затем полосы разделялись на две части: стартовую (0–4 см от нижнего края) и финишную (6–10 см) – соответствующие связанному с пептидом и свободному радионуклиду, соответственно. Радиоактивность ^{212}Pb на каждом фрагменте пластины измерялась на детекторе из сверхчистого германия с многоканальным анализатором при фиксированной геометрии при каждом измерении. Радиохимический выход реакции мечения определялся отношением активности ^{212}Pb на фрагменте пластины со стартом к общей активности, нанесенной на пластину [16].

Радиометрический анализ всех радиоактивных образцов проводили по интегралам фотопиков γ -линий 239, 583 и 727 кэВ от распадов ^{212}Pb , ^{208}Tl и ^{212}Bi соответственно, измеренных полупроводниковым Ge-детектором, соединенным с многоканальным анализатором (ORTEC GEM-25185).

Исследование цитотоксичности ^{212}Pb]DOTATATE проводилось на основе оценки метаболической активности клеток Rin-5F с применением реагента PrestoBlue (Thermo) [17] в соответствии с ISO 10993-5:2009 [18]. Для проведения анализа, клетки в концентрации 100×10^3 клеток/лунка помещали в лунки 24-луночного планшета в питательной среде DMEM/F-12 (Gibco) с добавлением 10 % FBS (Gibco), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) и оставляли на 24 ч для адгезии в инкубаторе в атмосфере 5 % CO_2 при 37°C. Через 24 ч делали добавки веществ в 3 повторностях ($n=3$) с шагом разведения в два раза: ^{212}Pb]DOTATATE, ^{212}Pb , DOTATATE с активностью ^{212}Pb на лунку от 6,25 до 100 кБк и концентрацией пептида от 1562,5 до 2500 нг/мл ^{212}Pb]DOTATATE. Инкубирование проводили в течение 22 ч. В качестве отрицательного контроля цитотоксичности были клетки без добавок веществ ($n=3$). Через 22 ч инкубирования проводили оценку метаболической активности. Производили замену питательной среды на 90 мкл HBSS с Ca^{2+} , Mg^{2+} (Gibco) и добавляли 10 мкл реагента PrestoBlue (Thermo). Для учета фонового значения реагент добавляли в питательную среду без клеток ($n=3$). Инкубирование с PrestoBlue проводили в течение 30 мин в условиях CO_2 -инкубатора. Затем проводили измерение флуоресценции (RFU) при длине волны возбуждения 530 нм и эмиссии 610 нм на планшетном фотометре Modulus II Microplate Multimode Reader (Promega). Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по формуле:

$$V = [(S - S_b) / (C - C_b)] \times 100 \%, \quad (1)$$

где S – значение RFU препарата с клетками, S_b – значение RFU препарата с PrestoBlue реагентом (фоновое значение препарата), C – значение RFU контроля, C_b – значение RFU PrestoBlue реагента (фоновое значение реагента).

Статистический анализ проводили в ПО GraphPad Prism версии 8.0 с применением метода двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с апостериорным тестом Даннета для статистической обработки данных по оценке цитотоксичности комплекса и компонентов комплекса ^{212}Pb]DOTATATE. Достоверность различий считали значимыми при $p < 0,05$.

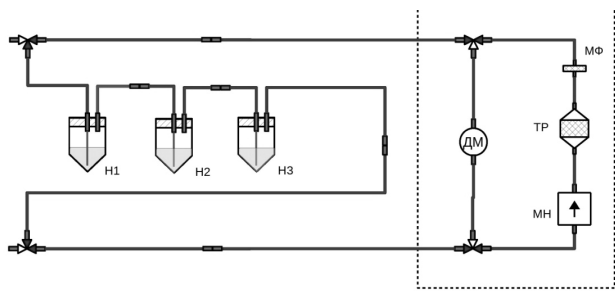


Рис. 1. Принципиальная схема генератора ^{212}Pb (разъяснения в тексте)

Экспериментальная часть

Источником радионуклида ^{212}Pb служил разработанный генератор $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$. Общая концепция установки на основе принципа получения ^{212}Pb из родительского радионуклида ^{228}Th была ранее реализована авторами в [19]. В настоящей работе использовался модифицированный вариант генератора, принципиальная схема которого показана на рис. 1. Реактор генератора (ТР) содержит смесь изотопов тория, в состав которой входит радионуклид ^{228}Th ($T_{1/2}=1,9$ г). Конструкция реактора обеспечивает требование, что только газ способен покидать его пределы [19]. В цепочке распада ^{228}Th присутствует газообразный радионуклид ^{220}Rn ($T_{1/2}=56$ с), который после удаления воздушным потоком с помощью мембранного насоса (МН) в отдельную систему накопителей (Н1–Н3), в результате ряда распадов переходит в ^{212}Pb ($T_{1/2}=10,64$ ч) и осаждается на его внутренних стенках. Благодаря такому разделению фаз исключается возможность попадания долгоживущих материнских изотопов в конечный препа-

рат. Это обеспечивает его очень высокую радионуклидную чистоту. В качестве элюента для смыва ^{212}Pb со стенок сосудов накопителя используется раствор 0,1 М НСl (рН 1,0). На рис. 1 МФ обозначает мембранный фильтр, ДМ – дифференциальный манометр для контроля уровня давления в коммуникациях генератора. После каждого цикла производства, составляющего 48 ч, удельная активность наработанного на генераторе ^{212}Pb составляла 450 кБк/мл. Отличие модификации генератора [19] от описанного состояло в использовании в качестве накопителя не системы сосудов, а длинной фторэтиленпропиленовой трубки (объем ~100 мл), использование которой позволяло проводить более удобную с точки зрения эксплуатации процедуру смыва наработанного ^{212}Pb . Однако в силу конструктивных особенностей генератора это обеспечивало удельную активность раствора с радионуклидом не выше 150 кБк/мл; в этой связи была предпринята попытка модернизации накопителя с целью увеличения диапазона доступных удельных активностей.

Для альфа-спектрометрического анализа наработанного образца из выделенного раствора ^{212}Pb отбирали аликвоту 30 мкл и затем наносили на металлическую подложку таким образом, чтобы жидкость была равномерно распределена на поверхности в форме окружности диаметром 6 мм. Поверхностная активность ^{212}Pb при этом составила 30 кБк/см². После этого препарат высушивали в течение двух часов при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Сухой остаток на подложке помещали в альфа-спектрометр ORTEC Alpha Suite Alpha Duo с разрешающей способностью до 20 кэВ, на расстоянии 1 см от детектора. Полученный альфа-спектр представлен на рис. 2.

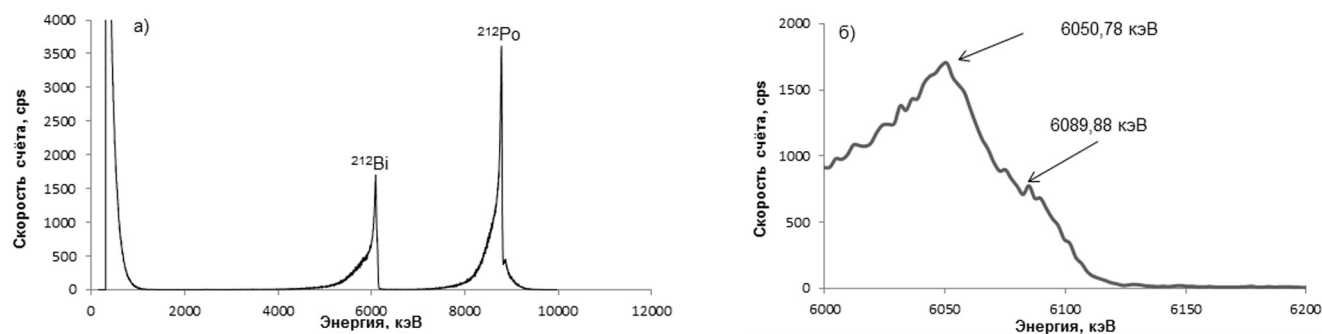


Рис. 2. Альфа-спектр образца на всём диапазоне доступных энергий (а), и на диапазоне 6000–6200 кэВ (б)

Как видно из рисунков, на спектре присутствуют только пики ^{212}Bi и ^{212}Po , причём в области энергий 6000–6200 кэВ видны оба пика ^{212}Bi , более энергетический из которых является менее вероятным, и потому гораздо более низким. Можно было бы предположить, что пики ^{228}Th и ^{224}Ra перекрываются высокоактивным ^{212}Bi с гораздо более коротким периодом полураспада, однако отсутствие на спектре пиков ^{220}Rn и ^{216}Po , дочерних продуктов ^{224}Ra , чьи периоды полураспада составляют менее минуты, говорит об отсутствии всех четверых материнских радионуклидов. Данный анализ позволяет сделать вывод о чистоте выделяемого препарата, однако для надёжности заключения был проведён более длительный альфа-спектрометрический анализ этого же образца спустя 10 суток, когда можно с уверенностью заявлять, что весь выделенный радионуклид ^{212}Pb и его дочерние радионуклиды подверглись распаду, а присутствие ^{228}Th можно определить даже в ультрамалых количествах за счёт дочерних ^{220}Rn и ^{216}Po . Образец измеряли в течение более двух часов, за это время не было замечено присутствия альфа-частиц с необходимыми энергиями, количество которых превышало бы фоновые значения, из чего сделан вывод о том, что выделенный образец ^{212}Pb обладает высокой радионуклидной чистотой и не содержит примесей материнских радионуклидов.

Синтез комплекса ^{212}Pb]DOTATATE проводился согласно следующей технологии. Водный раствор DOTATATE (0,01 мг/мл) добавлялся к раствору ^{212}Pb (450 кБк/мл), значение pH в котором предварительно устанавливалось до значений 2,5–3,0 путем добавления щелочного раствора, для предотвращения попадания пептида в сильноокислую среду. После добавления водного раствора DOTATATE в смесь добавлялось необходимое количество Na_2CO_3 концентрации 2 М для повышения уровня pH до значений 6,0–7,0. Конечный объём реакционной смеси составлял $1 \pm 0,1$ мл. Далее сосуд с реакционной смесью помещался в термостат при температуре $90 \pm 2^\circ\text{C}$. Реакция синтеза прерывалась охлаждением сосуда со смесью воздействием воды при температуре 15°C .

Мечение биоконъюгата DOTATATE радионуклидом ^{212}Pb проводилось согласно описанной выше процедуре, при этом с целью исследования зависимости радиохимического выхода

реакции мечения от молярной активности препарата варьировалось количество добавляемого в смесь раствора с пептидом. А именно, рассматривались значения молярной активности в 0,1, 0,5, 1, 2, 4, 10 МБк/нмоль.

Результаты и обсуждение

Ранее проводился синтез комплекса ^{212}Pb]DOTATATE низкой молярной активности, результаты приведены на рис. 3 [13], при этом поиск оптимальных условий мечения проводился с более долгоживущим изотопом ^{210}Pb . На рис. 3 указаны значения радиохимического выхода реакции мечения конъюгата DOTATATE радионуклидом ^{210}Pb . Видно, что высокая (>95 %) эффективность мечения была достигнута для активности ^{210}Pb , примерно равной активности ^{212}Pb , то есть, концентрация ионов ^{210}Pb составляла величину на два порядка большую концентрации ионов ^{212}Pb . Этот результат позволил предположить повышение концентрации ионов ^{212}Pb без уменьшения выхода реакции мечения, что и было проделано впоследствии в рамках данной работы.

После охлаждения реакционного сосуда для остановки реакции синтеза проводился анализ эффективности мечения согласно описанной выше процедуре. На рис. 4 изображена зависимость радиохимического выхода реакции мечения от молярной активности препарата. Из рисунка видно, что стабильные результаты по радиомечению были достигнуты вплоть до значения 1 МБк/нмоль. Несмотря на

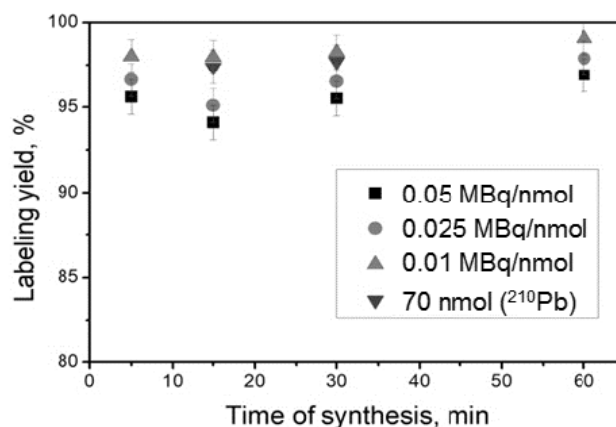


Рис. 3. Зависимость выхода реакции мечения $^{212}\text{Pb}/^{210}\text{Pb}$]DOTATATE от времени синтеза [13]

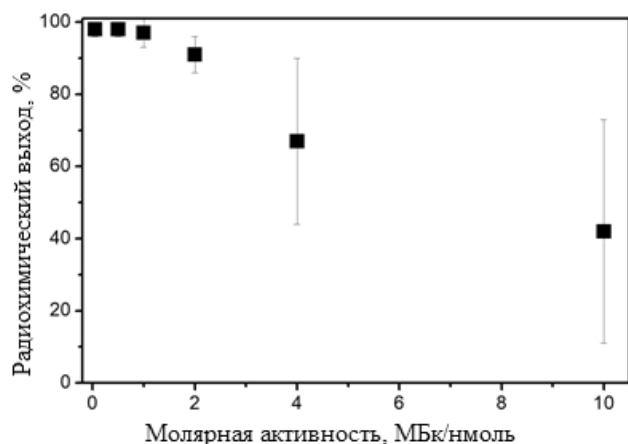


Рис. 4. Зависимость выхода реакции мечення [^{212}Pb]DOTATATE от молярной активности

то, что достигнутые значения используются в исследованиях по ПРРТ [9], представляется, что стабильные результаты выхода реакции мечення препаратов более высокой молярной активности могут быть достигнуты путем очищения раствора, содержащего ^{212}Pb , с помощью методов ионообменной хроматографии.

Следует также отметить, что согласно исследованиям [20], в случае меченых соединений существует зависимость между устойчивостью синтезированного комплекса и его удельной активностью по причине радиолитического разрушения препарата. Поскольку количество доступных на клеточной мембране рецепторов ограничено, достижение высокой удельной активности меченых пептидов является важным аспектом производства терапевтических радиофармпрепаратов, в связи с чем проблема диссоциации комплексов высокой удельной активности является одной из важнейших при их разработке. По этой причине отдельный интерес могут представлять исследования по диссоциативной стабильности комплекса в физиологических средах в случае высокой молярной активности.

Оценку цитотоксичности [^{212}Pb]DOTATATE определяли путем анализа метаболической активности клеток Rin-5F после 22 ч культивирования с [^{212}Pb]DOTATATE; культивирование с ^{212}Pb и с DOTATATE служило в качестве контролей. Для этих исследований использовались низкие значения молярной активности (до 0,05 МБк/нмоль) комплекса

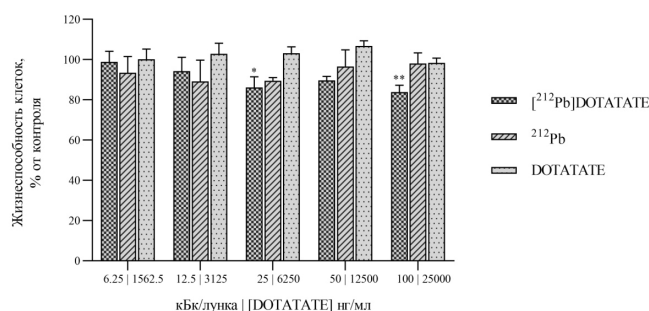


Рис. 5. Графики процентного значения жизнеспособности Rin-5F по результатам PrestoBlue анализа, после 22 часов инкубирования образцами. Сравнение относительно группы отрицательного контроля цитотоксичности методом two-way ANOVA с апостериорным тестом Даннета. * $p < 0,05$, ** $p < 0,002$. Данные представлены как средние значения \pm SD

[^{212}Pb]DOTATATE. Результаты анализа показали, что ^{212}Pb в диапазоне 6,25–100 кБк/лунка и DOTATATE в диапазоне 1562,5–25000 нг/мл не оказывают токсического действия на Rin-5F ($p > 0,05$) относительно группы отрицательного контроля. Исследуемый комплекс [^{212}Pb]DOTATATE достоверно снижает жизнеспособность клеток Rin-5F при 6250 нг/мл DOTATATE меченого ^{212}Pb с активностью 25 кБк/лунка ($p = 0,0345$) и при 25000 нг/мл DOTATATE меченого ^{212}Pb с активностью 100 кБк/лунка ($p = 0,0086$) относительно группы отрицательного контроля. На рис. 5 представлена диаграмма процентных значений метаболической активности Rin-5F относительно группы отрицательного контроля. Можно видеть, что в первом случае (25 кБк/лунка) различие цитотоксического эффекта от чистого радионуклида ($89,4 \pm 1,5$ %) и от исследуемого комплекса ($86,1 \pm 4,2$ %) практически отсутствует, а при самой высокой концентрации (100 кБк/лунка) различие в цитотоксическом эффекте ($98,1 \pm 4,8$ % и $83,3 \pm 2,8$ %, соответственно) становится явно различимым.

Этот факт связан с высокой статистической погрешностью, в особенности в случае значений цитотоксичности от чистого ^{212}Pb . Тем не менее, несмотря на сравнительно большой разброс значений воздействия от чистого радионуклида, однозначно показан цитотоксический эффект исследуемого препарата в случае его высокой концентрации при инкубировании с клетками-мишенями.

Заключение

Разработанный генератор создавался для экспериментальных работ по синтезу прототипов радиофармпрепаратов и проведения *in vitro* и *in vivo* испытаний синтезированных биологических комплексов. Нарботанные образцы позволяют получить прототип радиофармпрепарата высокой молярной активности для дальнейших исследований. Полученные результаты по исследованию цитотоксичности позволяют рассматривать комплекс [²¹²Pb]DOTATATE в качестве перспективного радиофармпрепарата, что открывает дорогу к дальнейшим исследованиям по диссоциативной устойчивости, а также биораспределению конъюгата.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ №1363 от 25.06.2019 г.).

Список литературы

- Barbieri F., Bajetto A., Pattarozzi A. et al. Peptide Receptor Targeting in Cancer: The Somatostatin Paradigm // *Int. J. Peptides*. 2013. Vol. 2013. P. 1–20.
- Xu C., Zhang H. Somatostatin Receptor Based Imaging and Radionuclide Therapy // *BioMed. Res. Int.* 2015. Vol. 2015. P. 1–15.
- Ferrier M.G., Radchenko V., Wilbur D.S. Radiochemical aspects of alpha emitting radionuclides for medical application // *Radiochimica Acta*. 2019.
- Brechbiel M. W. Targeted α -therapy: past, present, future? // *Dalton Transactions*. 2007. Vol. 43. P. 4918–4928.
- Yong K., Brechbiel M.W. Towards translation of ²¹²Pb as a clinical therapeutic; getting the lead in! // *Dalton Transactions*. 2011. Vol. 40. P. 6068–6076.
- Graf F., Fahrner G., Maus S. et al. DNA Double Strand Breaks as Predictor of Efficacy of the Alpha-Particle Emitter Ac-225 and the Electron Emitter Lu-177 for Somatostatin Receptor Targeted Radiotherapy // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. P. 1–10.
- Kasten B., Gangrade A., Kim H. et al. ²¹²Pb-labeled B7-H3-targeting antibody for pancreatic cancer therapy in mouse models // *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 2018. Vol. 58. P. 67–73.
- Kasten B., Oliver P., Kim H. et al. ²¹²Pb-Labeled Antibody 225.28 Targeted to Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 for Triple-Negative Breast Cancer Therapy in Mouse Models // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. P. 925–941.
- Li M., Zhang X., Quinn T.P. et al. Automated cassette-based production of high specific activity [^{203/212}Pb]peptide-based theranostic radiopharmaceuticals for image-guided radionuclide therapy for cancer // *Appl. Radiat. Isotopes*. 2017. Vol. 127. P. 52–60.
- Elgqvist J., Frost S., Pouget J.-P., Albertsson P. The potential and hurdles of targeted alpha therapy – clinical trials and beyond // *Frontiers in Oncology*. 2014. Vol. 3. P. 1–9.
- Edem P., Fonslet J., Kjaer A. et al. *In Vivo* Radionuclide Generators for Diagnostics and Therapy // *Bioinorg. Chem. Appl.* 2016. Vol. 2016. P. 1–8.
- Rozgaja Stallons T.A., Saidi A., Tworowska I. et al. Preclinical Investigation of ²¹²Pb-DOTAM-TATE for Peptide Receptor Radionuclide Therapy in a Neuroendocrine Tumor Model // *Mol. Cancer Ther.* 2019. Vol. 18. P. 1012–1021.
- Chuvilin D.Yu., Kokov K.V., Egorova B.V. et al. Synthesis and investigation of a preparation based on ²¹²Pb-labeled DOTATATE synthetic peptide for therapy of neuroendocrine tumors // *AIP Conf. Proc.* 2019. Vol. 2101.
- Oeberg K., Kvols L., Caplin M. et al. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system // *Ann. Oncol.* 2004. Vol. 15. P. 966–973.
- Oliveira I. M., Martins P. de A., Silva J. L. et al. Alternative Methods for Radiochemical Purity Testing in Radiopharmaceuticals. – Brazil: 2011 International Nuclear Atlantic Conference. 2011.
- Baidoo K.E., Milenic D.E., Brechbiel M.W. Methodology for labeling proteins and peptides with lead-212 (²¹²Pb) // *Nucl. Med. Biol.* 2013. Vol. 40. P. 592–599.
- Nakayama G.R., Caton M.C., Nova M.P., Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro // *J. Immunol. Methods*. 1997. Vol. 204. P. 205–208.
- International Organization for Standardization: Geneva, S., ISO E N. 10993-5. Biological

- Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity. 2009. // J. Phys.: Conference Series. 2018. Vol. 1099.
19. Boldyrev P.P., Egorova B.V., Kokov K.V. et. al. Physical and chemical processes on the ^{212}Pb radionuclide production for nuclear medicine // J. Phys.: Conference Series. 2018. Vol. 1099.
20. Comparative Evaluation of Therapeutic Radiopharmaceuticals. – Vienna.: International Atomic Energy Agency. 2007. 312 pp.

PRODUCTION AND INVESTIGATION OF $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$ COMPLEX FOR THERAPY OF NEUROENDOCRINE TUMORS

K.V. Kokov^{1,2}, A.G. Demchenko³, B.V. Egorova⁴, A.A. Larkin¹, A.V. Lyundup³, K.A. Makoveeva¹, A.N. Moiseeva¹, V.Ya. Panchenko^{1,2}, M.A. Proshin¹, I.V. Reshetov^{1,3}, D.Yu. Chuvilin^{1,2}

¹ National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, Russia

² Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

A method for obtaining a $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$ radiopharmaceutical prototype for investigations in the field of neuroendocrine tumors therapy has been developed. A laboratory generator of β -emitting radionuclide ^{212}Pb with an operating efficiency of 40 % has also been developed. To determine the cytotoxic effect of the $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$ complex, somatostatin receptor-expressing pancreatic cancer cells (Rin-m5F cell line) were incubated with $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTATATE}$; cell survival was determined using Presto Blue analysis.

Key words: radiopharmaceutical, neuroendocrine tumors, nuclear medicine, radionuclide production, cytotoxicity

E-mail: kvkokov@yandex.ru