

## Разработка способов получения комплексов технеция-99m с рекомбинантными адресными белками для визуализации ЕрСAM экспрессирующих злокачественных образований

© Фоминых<sup>1</sup> Анастасия Сергеевна, Варвашеня<sup>1</sup> Руслан Николаевич, Янович<sup>1</sup> Глеб Евгеньевич, Третьякова<sup>1</sup> Мария Сергеевна, Зиганшин<sup>2</sup> Рустам Хусманович, Шульга<sup>1,3</sup> Алексей Анатольевич, Деев<sup>1,3\*</sup> Сергей Михайлович, Плотников<sup>1</sup> Евгений Владимирович, Юсубов<sup>4</sup> Мехман Сулейман оглы, Ларькина<sup>1,5\*\*</sup> Мария Сергеевна

<sup>1</sup> Научно-исследовательский центр «Онкотераностика»; <sup>4</sup> Научно-исследовательская школа химических и биомедицинских технологий. Научно-исследовательская школа химических и биомедицинских технологий. Томский политехнический университет. пр. Ленина, 30. г. Томск, 634050. Россия. Тел.: +7 (382) 260-63-33.

<sup>2</sup> Центр коллективного пользования “Биоорганика”; <sup>3</sup> Лаборатория молекулярной иммунологии.

Институт биоорганической химии им. Шенякина и Овчинникова Российской академии наук. ул. Миклухо-Маклая, д.16/10. г. Москва, 117997. Россия. Тел.: +7 (495) 335-01-00. E-mail: office@ibch.ru

<sup>5</sup> Кафедра фармацевтического анализа. Сибирский государственный медицинский университет. Московский тракт, стр.2. г. Томск, 634050. Россия. Тел.: +7 (3822) 901-101. E-mail: kaf.farm.himii@ssmu.ru

\*Ведущий направление; \*\*Поддерживающий переписку

**Ключевые слова:** технеций-99m, DARPin, ЕрСAM, ОФЭКТ, HYNIC, молекулярная визуализация, радиофармпрепараты, рекомбинантные белки, сайт-специфическое мечение.

### Аннотация

В работе представлены результаты разработки и сравнительной оценки методов получения комплексов технеция-99m с рекомбинантными адресными белками на основе анкириновых повторов (DARPin) варианта Ec1, направленных на молекулу клеточной адгезии эпителия (ЕрСAM), для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии злокачественных новообразований. Для решения задачи были сконструированы новые варианты белка Ec1, несущие пептидные хелатирующие последовательности G<sub>3</sub>C и E<sub>3</sub>C как на N-, так и на C-конце, а также использован ранее охарактеризованный вариант с (HE)<sub>3</sub>-повтором для карбонильного метода мечения.

Исследование включало три стратегии радиомечения: прямое мечение через трикарбонильное ядро технеция-99m, сайт-специфическое мечение с помощью оксотехнециевого ядра через встроенные цистеинсодержащие пептидные хелаторы типа N<sub>3</sub>S, а также конъюгацию с бифункциональным хелатором HYNIC малеимид с последующим радиомечением. Показано, что ключевым фактором, определяющим эффективность синтеза, является положение хелаторной последовательности: C-концевое расположение пептидных хелаторов обеспечивает наилучший радиохимический выход (до 98%) и высокую стабильность комплексов в физиологических условиях в течение не менее шести часов. Метод карбонильного мечения, несмотря на высокую чистоту продуктов, оказался многостадийным и требующим специализированных реагентов. Конъюгация с HYNIC малеимидом продемонстрировала более низкие выходы и потребовала дополнительной оптимизации.

Биологические исследования *in vitro* на клеточных линиях с различной экспрессией ЕрСAM подтвердили сохранение специфичности и высокой аффинности всех полученных радиоактивных комплексов к мишени. Наилучшим кандидатом для дальнейших доклинических исследований признан комплекс технеция-99m с C-концевым вариантом Ec1-G<sub>3</sub>C, полученный методом прямого сайт-специфического мечения оксотехнециевым ядром.

### Выходные данные для цитирования русскоязычной печатной версии статьи:

Фоминых А.С., Варвашеня Р.Н., Янович Г.Е., Третьякова М.С., Зиганшин Р.Х., Шульга А.А., Деев С.М., Плотников Е.В., Юсубов М.С., Ларькина М.С. Разработка способов получения комплексов технеция-99m с рекомбинантными адресными белками для визуализации ЕрСAM экспрессирующих злокачественных образований. *Бутлеровские сообщения*. 2026. Т.87. №8. С.79-91. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-87-8-79

### Выходные данные для цитирования русскоязычной электронной версии статьи:

Фоминых А.С., Варвашеня Р.Н., Янович Г.Е., Третьякова М.С., Зиганшин Р.Х., Шульга А.А., Деев С.М., Плотников Е.В., Юсубов М.С., Ларькина М.С. Разработка способов получения комплексов технеция-99m с рекомбинантными адресными белками для визуализации ЕрСAM экспрессирующих злокачественных образований. *Бутлеровские сообщения* С. 2026. Т.14. №3. Id.8. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-87-8-79/ROI-jbc-C/26-14-3-8 (Russian)

**The output for citing the English online version of the article:**

Anastasia S. Fominykh, Ruslan N. Varvashenya, Gleb E. Yanovich, Maria S. Tretyakova, Rustam H. Ziganshin, Alexey A. Schulga, Sergey M. Deyev, Evgeny V. Plotnikov, Mekhman S. Yusubov, Maria S. Larkina. Development of methods for producing technetium-99m complexes with recombinant targeting proteins for imaging of EpCAM-expressing malignant neoplasms. *Butlerov Communications C.* **2026.** Vol.14. No.3. Id.8. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-87-8-79/ROI-jbc-C/26-14-3-8

**Литература**

- [1] Брагина О.Д., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Ларькина М.С. Альтернативные каркасные белки в радионуклидной диагностике злокачественных образований. *Бюл. сиб. медицины.* **2019.** №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/alternativnye-karkasnye-belki-v-radionuklidnoy-diagnostike-zlokachestvennyh-obrazovaniy> (дата обращения: 12.12.2025). [Bragina O.D., Chernov V.I., Zelchan R.V., Sinilkin I.G., Medvedeva A.A., Larkina M.S. Alternative scaffold proteins in radionuclide diagnostics of malignant neoplasms. *Bulletin of Siberian Medicine.* **2019.** No.3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/alternativnye-karkasnye-belki-v-radionuklidnoy-diagnostike-zlokachestvennyh-obrazovaniy> (accessed: 12.12.2025) (Russian)]
- [2] Altunay B., Morgenroth A., Beheshti M., *et al.* HER2-directed antibodies, affibodies and nanobodies as drug-delivery vehicles in breast cancer with a specific focus on radioimmunotherapy and radioimmunimaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2021.** Vol.48. P.1371-1389. DOI:10.1007/s00259-020-05094-1
- [3] Gebauer M., Skerra A. Engineered protein scaffolds as next-generation therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2020.** Vol.60. P.391-415. DOI:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021118
- [4] Deyev S.M., Vorobyeva A., Schulga A., Abouzayed A., Günther T., Garousi J., Konovalova E., Ding H., Gräslund T., Orlova A., Tolmachev V. Effect of a radiolabel biochemical nature on tumor-targeting properties of EpCAM-binding engineered scaffold protein DARPIn Ec1. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020.** Vol.145. P.216-225.
- [5] Vorobyeva A., *et al.* Selection of the optimal chelator for labeling of DARPIn Ec1 with gallium-68 for PET imaging of EpCAM expression. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2025.** Vol.10. No.1. P.26. DOI:10.1186/s41181-025-00347-6.
- [6] Zelchan R., Chernov V., Medvedeva A., Rybina A., Bragina O., Mishina E. *et al.* Phase I clinical evaluation of designed ankyrin repeat protein [99mTc]Tc(CO)3-(HE)3-Ec1 for visualization of EpCAM-expressing lung cancer. *Cancers.* **2024.** Vol.16. No.16. P.2815. DOI:10.3390/cancers16162815
- [7] Ma M.T. Receptor-targeted technetium-99m radiopharmaceuticals: increasing access to molecular imaging in healthcare. *Front. Chem. Biol.* **2025.** Vol.4. P.1729615.
- [8] Maruk A.Y., Bruskin A.B., Kodina G.E. Novel 99mTc radiopharmaceuticals with bifunctional chelating agents. *Radiochemistry.* **2011.** Vol.53. P.341-353. DOI:10.1134/S1066362211040011
- [9] King R.C., *et al.* How do HYNIC-conjugated peptides bind technetium? Insights from LC-MS and stability studies. *Dalton Trans.* **2007.** No.43. P.4998-5007.
- [10] Alberto R., *et al.* A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of [99mTc(OH2)3(CO)3]<sup>+</sup> from [99mTcO4]<sup>-</sup> in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **1998.** Vol.120. No.31. P.7987-7988.
- [11] Bragina O., Chernov V., Schulga A., Konovalova E., Garbukov E., Vorobyeva A., *et al.* Phase I trial of 99mTc-(HE)3-G3, a DARPIn-based probe for imaging of HER2 expression in breast cancer. *J. Nucl. Med.* **2022.** Vol.63. No.4. P.528-535. DOI:10.2967/jnumed.121.262542
- [12] Meszaros L.K., *et al.* Hydrazinonicotinic acid (HYNIC)–Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorg. Chim. Acta.* **2010.** Vol.363. No.6. P.1059-1069.
- [13] Larkina M., *et al.* Comparative *Preclinical Evaluation* of HYNIC-modified designed ankyrin repeat proteins G3 for the 99mTc-based imaging of HER2-expressing malignant tumors. *Mol. Pharmaceutics.* **2024.** Vol.21. No.4. P.1919-1932.
- [14] Ekblad T., *et al.* Positioning of 99mTc-chelators influences radiolabeling, stability and biodistribution of Affibody molecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009.** Vol.19. No.14. P.3912-3914.
- [15] Oroujeni M., *et al.* Influence of composition of cysteine-containing peptide-based chelators on biodistribution of 99mTc-labeled anti-EGFR affibody molecules. *Amino Acids.* **2018.** Vol.50. No.8. P.981-994.
- [16] Кодина Г.Е., Малышева А.О., Ларенков А.А., Брускин А.Б. Присутствие возможных примесей в радиофармацевтических лекарственных препаратах и методы их определения. *Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* **2022.** Т.12. №3. С.244-262. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-3-244-262. [Kodina G.E., Malysheva A.O., Larenkov A.A., Bruskin A.B. Presence of possible impurities in radiopharmaceutical drugs and methods for their determination. *NCESMP*

- РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ ТЕХНЕЦИЯ-99М С РЕКОМБИНАНТНЫМИ... 79-91  
*Bulletin. Regulatory Research and Evaluation of Medicines*. **2022**. Vol.12. No.3. P.244-262. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-3-244-262. (Russian)]
- [17] Larkina M., Plotnikov E., Bezverkhniaia E., Shabanova Y., Tretyakova M., Yuldasheva F., *et al.* Comparative preclinical evaluation of peptide-based chelators for the labeling of DARPIn G3 with <sup>99m</sup>Tc for radionuclide imaging of HER2 expression in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**. Vol.23. No.21. P.13443. DOI:10.3390/ijms232113443
  - [18] Bezverkhniaia E., Kanellopoulos P., Abouzayed A., Larkina M., Oroujeni M., Vorobyeva A. *et al.* Preclinical evaluation of a novel high-affinity radioligand [<sup>99m</sup>Tc]Tc-BQ0413 targeting prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Int. J. Mol. Sci.* **2023**. Vol.24. No.24. P.17391. DOI:10.3390/ijms242417391
  - [19] Garousi J., Lindbo S., Mitran B., Buijs J., Vorobyeva A., Orlova A. *et al.* Comparative evaluation of tumor targeting using the anti-HER2 ADAPT scaffold protein labeled at the C-terminus with indium-111 or technetium-99m. *Sci. Rep.* **2017**. Vol.7. No.1. P.14780. DOI:10.1038/s41598-017-15366-w
  - [20] Bragina O., Chernov V., Larkina M., Rybina A., Zelchan R., Garbukov E. *et al.* Phase I clinical evaluation of <sup>99m</sup>Tc-labeled Affibody molecule for imaging HER2 expression in breast cancer. *Theranostics*. **2023**. Vol.13. No.14. P.4858. DOI:10.7150/thno.86770
  - [21] Stefan N., *et al.* DARPins recognizing the tumor-associated antigen EpCAM selected by phage and ribosome display and engineered for multivalency. *J. Mol. Biol.* **2011**. Vol.413. No.4. P.826-843. DOI:10.1016/j.jmb.2011.09.016
  - [22] Malakhov M.P., *et al.* SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics*. **2004**. Vol.5. No.1-2. P.75-86.
  - [23] Hasnowo L.A., Larkina M.S., Plotnikov E., Bodenko V., Yuldasheva F., Stasyuk E., *et al.* Synthesis, <sup>123</sup>I-radiolabeling optimization, and initial preclinical evaluation of novel urea-based PSMA inhibitors with a tributylstannyl prosthetic group in their structures. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**. Vol.24. P.12206. DOI:10.3390/ijms241512206
  - [24] Wällberg H., *et al.* Molecular design and optimization of <sup>99m</sup>Tc-labeled recombinant affibody molecules improves their biodistribution and imaging properties. *J. Nucl. Med.* **2011**. Vol.52. No.3. P.461-469.
  - [25] Decristoforo C., Mather S.J. <sup>99m</sup>Tc-Technetium-labelled peptide-HYNIC conjugates: effects of lipophilicity and stability on biodistribution. *Nucl. Med. Biol.* **1999**. Vol.26. No.4. P.389-396. DOI:10.1016/s0969-8051(98)00118-8
  - [26] Anastasia S. Fominykh, Ruslan N. Varvashenya, Gleb E. Yanovich, Maria S. Tretyakova, Rustam H. Ziganshin, Alexey A. Schulga, Sergey M. Deyev, Evgeny V. Plotnikov, Mekhman S. Yusubov, Maria S. Larkina. Development of methods for producing technetium-99m complexes with recombinant targeting proteins for imaging of EpCAM-expressing malignant neoplasms. *Butlerov Communications C.* **2026**. Vol.14. No.3. Id.8. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-87-8-79/ROI-jbc-C/26-14-3-8
  - [27] Фоминых А.С., Варвашеня Р.Н., Янович Г.Е., Третьякова М.С., Зиганшин Р.Х., Шульга А.А., Деев С.М., Плотников Е.В., Юсубов М.С., Ларькина М.С. Разработка способов получения комплексов технеция-99м с рекомбинантными адресными белками для визуализации EpCAM экспрессирующих злокачественных образований. *Бутлеровские сообщения C.* **2026**. Т.14. №3. Id.8. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-87-8-79/ROI-jbc-C/26-14-3-8 (Russian)

The English version of the article has been published in the international edition of the journal

**Butlerov Communications C**  
*Advances in Biochemistry & Technologies*

The Reference Object Identifier – ROI: jbc-C/26-14-3-8

The Digital Object Identifier – DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-87-8-79/ROI-jbc-C/26-14-3-8

**Development of methods for producing technetium-99m  
complexes with recombinant targeting proteins  
for imaging of EpCAM-expressing malignant neoplasms**

Anastasia S. Fominykh,<sup>1</sup> Ruslan N. Varvashenya,<sup>1</sup> Gleb E. Yanovich,<sup>1</sup> Maria S. Tretyakova,<sup>1</sup>  
Rustam H. Ziganshin,<sup>2</sup> Alexey A. Schulga,<sup>1,3</sup> Sergey M. Deyev,<sup>1,3\*</sup> Evgeny V. Plotnikov,<sup>1</sup>  
Mekhman S. Yusubov,<sup>4</sup> Maria S. Larkina<sup>1,5\*+</sup>

<sup>1</sup> Research Center "Oncotheranostics"; <sup>4</sup> Research School of Chemical and Biomedical Technologies. Research School of Chemical and Biomedical Technologies. Tomsk Polytechnic University. Lenin Ave., 30. Tomsk, 634050. Russia. Phone: +7 (382) 260-63-33. E-mail: tpu@tpu.ru

<sup>2</sup> Center for Collective Use "Bioorganica"; <sup>3</sup> Laboratory of Molecular Immunology. Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry. Phone: +7 (495) 335-01-00. E-mail: office@ibch.ru

<sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Analysis. Siberian State Medical University. Moscow Trakt, 2. Tomsk, 634050. Russia. Phone: +7 (3822) 901-101. E-mail: kaf.farm.himii@ssmu.ru

\*Corresponding author; +Supporting correspondence

**Keywords:** technetium-99m, DARPin, EpCAM, SPECT, HYNIC, molecular imaging, radiopharmaceuticals, recombinant proteins, site-specific labeling.

**Abstract**

The paper presents the results of the development and comparative evaluation of methods for producing technetium-99m complexes with recombinant designed ankyrin repeat proteins (DARPin) of the Ec1 variant targeting epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) for single-photon emission computed tomography of malignant neoplasms. To address this task, novel Ec1 protein variants bearing G<sub>3</sub>C and E<sub>3</sub>C peptide chelating sequences at both the N- and C-termini were constructed, along with the previously characterized (HE)<sub>3</sub>-containing variant for the carbonyl labeling method.

The study encompassed three radiolabeling strategies: direct labeling via the technetium-99m tricarbonyl core, site-specific labeling using the oxotechnetium core through engineered cysteine-containing N<sub>3</sub>S-type peptide chelators, and conjugation with the bifunctional chelator HYNIC maleimide followed by radiolabeling. It was demonstrated that the key factor determining synthesis efficiency is the position of the chelator sequence: C-terminal placement of peptide chelators provided the highest radiochemical yield (up to 98%) and high stability of the complexes under physiological conditions for at least six hours. The carbonyl labeling method, despite high product purity, proved to be multistep and required specialized reagents. Conjugation with HYNIC maleimide showed lower yields and required additional optimization.

*In vitro* biological studies on cell lines with varying EpCAM expression confirmed the preservation of specificity and high affinity of all obtained radioactive complexes for the target. The technetium-99m complex with the C-terminal Ec1-G<sub>3</sub>C variant, obtained by direct site-specific labeling with the oxotechnetium core, was identified as the best candidate for further preclinical studies.