

На правах рукописи

Нуртдинов Руслан Фаритович

Получение радиофармацевтических препаратов направленного действия,  
меченных радионуклидами висмута и лютеция

02.00.01 – Неорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук



Москва 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении  
Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт»

Научный руководитель  
(консультант)

**Гуцевич Евгений Игоревич,**  
кандидат химических наук,  
НИЦ «Курчатовский институт»

Официальные оппоненты:

**Ревина Александра Анатольевна,**  
доктор химических наук, профессор,  
ведущий научный сотрудник Института  
физической химии и электрохимии им.  
А.Н. Фрумкина РАН

**Алиев Рамиз Автандилович,**  
кандидат химических наук, ведущий  
научный сотрудник МГУ имени  
М.В. Ломоносова, Химический  
факультет

Ведущая организация

ФГУП «Государственный научный центр  
Российской Федерации Физико-  
энергетический институт имени  
А.И. Лейпунского

Защита состоится **02 октября 2018 г. в 11:00** на заседании диссертационного  
совета Д 520.009.05 на базе Национального исследовательского центра  
«Курчатовский институт» по адресу: 123182, г. Москва, пл. Академика  
Курчатова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатовский  
институт» и на сайте [www.nrcki.ru](http://www.nrcki.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета д.х.н.



В.Ф. Серик

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность работы**

Адресное воздействие на опухолевые ткани – важнейшая проблема современной онкологии. Основное внимание исследователей направлено на повышение концентрации действующих препаратов непосредственно в опухолях за счет их целевой доставки, что позволяет существенно снизить дозы препаратов для лечения и уменьшить системную интоксикацию организма.

Фокусировки терапевтических агентов в заданном месте организма можно добиться биохимическими либо физическими методами. Новые возможности в лечении рака открылись после разработки технологии создания линии моноклональных антител (МАТ). На базе МАТ разработан многообещающий метод иммунотерапии, с применением различных препаратов, которыми метят антитела, обладающие специфической способностью направленной доставки препаратов к злокачественным клеткам.

Для уничтожения раковых клеток в иммунотерапии используют различные способы: повреждение мембраны, нарушение работы генетического аппарата клетки, перенесение через мембрану лекарственных препаратов и др. Степень поражающего воздействия препарата на клетку определяется цитотоксичностью, т.е. способностью вызывать патологические изменения в клетках живого организма. Многочисленные эксперименты показывают, что в ряде случаев радионуклиды цитотоксичны в большей степени, чем другие терапевтические агенты. Метод с использованием радионуклидов получил название мишенной терапии (target therapy).

Особую опасность в процессе лечения злокачественных новообразований представляют микроскопические очаги опухолевого роста, для которых, в отличие от макроскопических видимых местных поражений, не может быть поставлена задача полного излечения хирургическим путем. Лучевая терапия и химиотерапия часто не дают радикального уничтожения указанных очагов из-за существенной неизбирательности воздействия – лечение прекращается из-за побочного повреждения здоровых тканей. Не

уничтоженные микроскопические очаги в дальнейшем становятся источниками рецидивов.

Решение этой проблемы наиболее эффективно достигается методами радиоиммунотерапии (РИТ), когда лекарственные препараты на основе антител, метят радионуклидами, излучающими  $\alpha$ - или  $\beta$ -частицы, имеющие малую глубину проникновения в биологические ткани, которые могут обеспечить избирательное уничтожение опухоли при минимальном повреждении здоровых клеток.

В качестве нацеливающего агента при создании средств адресной доставки лекарственных препаратов, чаще всего применяются модифицированные полноразмерные мышинные антитела либо пептиды. Однако, известно, что они имеют существенные ограничения, связанные в первую очередь с тем, что, будучи чужеродными белками, сами вызывают иммунный ответ в организме человека. Значительной части проблем удается избежать, если использовать не полноразмерное антитело, а лишь его часть, необходимую для распознавания антигена. Оптимальными для этих целей являются конструкции, состоящие из одних переменных доменов иммуноглобулиновой молекулы. Они полностью лишены константных доменов исходного мышинного антитела, вследствие чего обладают существенно меньшей иммуногенностью для организма человека. Еще более эффективными являются «гуманизированные» мини-антитела, в которых только участки, непосредственно взаимодействующие с антигеном, берутся из мышинного иммуноглобулина, а связывающие их каркасные фрагменты – из антитела человека.

Одним из наиболее изученных и часто упоминаемых в литературе опухолевых антигенов является поверхностный рецептор HER2/neu. Повышенный уровень экспрессии этого антигена играет ключевую роль в патогенезе злокачественных опухолей груди, печени и некоторых других форм злокачественных новообразований. К этому антигену разработан ряд моноклональных антител, пригодных для применения в диагностических и терапевтических целях.

В настоящей работе в качестве полимера, на котором закрепляют мини-антитела, выбран белок человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Использование этого белка не приводит к иммунологическим реакциям у

человека. Поэтому он используется в качестве стабилизатора и наполнителя при инъекции меченных радионуклидами мини-антител. Человеческий сывороточный альбумин несет на своей поверхности большое количество доступных аминокрупп, к которым можно пришивать молекулы мини-антител. Меняя количества внесенных сшивающих агентов в оба белка, а также соотношение между молекулами разных белков (в данном случае мини-антител и ЧСА) можно добиться контролируемого количества внесенных мини-антител на молекулу ЧСА.

Среди наиболее перспективных радионуклидов для терапии рака выделяется  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , обладающие оптимальными характеристиками для использования в ядерной медицине: удобный период полураспада, приемлемая энергия  $\alpha$ - или  $\beta$ -частиц. Сравнительно небольшая длина пробега заряженных частиц в биологических тканях, при локализации значительного количества атомов радионуклида в непосредственной близости от опухолевой клетки, обеспечивает избирательное уничтожение опухоли при минимальном повреждении окружающих тканей. Поскольку  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  испускают одновременно с заряженными частицами и  $\gamma$ -кванты, эти радионуклиды подходят как для диагностики и локализации, так и для терапии злокачественных новообразований.

### **Цели и задачи работы**

Целью диссертации являлось:

- разработка и оптимизация методов синтеза биологической наноконструкции для направленной доставки радионуклидов, используемых при диагностике и терапии онкологических заболеваний;
- получение радионуклидов  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  и выбор оптимальной химической формы стабилизации ионов прекурсора для получения РФП;
- аффинаж целевых радионуклидов от сопутствующих примесных металлов, позволяющий получить продукт с низким содержанием металлов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- разработать методы включения трехвалентных металлов в молекулы бифункциональных хелатирующих агентов p-SCN-Bn-DTPA и DOTA-NHS-ester;
- разработать и оптимизировать способы получения

радионуклидов  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ;

— разработать и испытать прототипы модулей кондиционирования элюата генераторов  $^{220}\text{Rn}/^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$  и  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ ;

— разработать и испытать прототип модуля синтеза конъюгата белков HSA и BSA с мини-антителом и хелатором, меченных радионуклидами;

— продемонстрировать универсальность разработанной биологической наноконструкции, позволяющей включать с ее состав широкий спектр медицинских радионуклидов;

— обеспечить автоматизацию полного цикла получения РФП.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

- изучены основные технологические аспекты получения радионуклидов  $^{212}\text{Bi}$  и  $^{177}\text{Lu}$ ;

- исследовано влияние условий синтеза комплекса ЧСА(БСА)-ДТРА(DOTA)-антитело-Bi(Lu) на выход целевого продукта;

- созданы и испытаны прототипы радионуклидных генераторов и модуля синтеза, последовательное соединение которых позволяет получать фармацевтическую субстанцию для дальнейших исследований;

- проведено первичное биологическое тестирование биоконъюгатов, меченных радионуклидом  $^{213}\text{Bi}$ , и продемонстрирована функциональная пригодность ЧСА(БСА)-ДТРА(DOTA)-антитело-Bi для использования в качестве нового отечественного радиофармпрепарата для терапии в онкологии.

### **Положения, выносимые на защиту**

- разработка методов синтеза биологической наноконструкции для направленной доставки медицинских радионуклидов;

- результаты разделения  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  от материнских радионуклидов для генераторных систем и от примесных металлов для последующего применения;

- параметры технологических процессов, обеспечивающие получение РФП надлежащего качества;

- разработка автоматизированной системы радионуклидных генераторов и автоматизированной системы получения РФП.

## **Апробация результатов**

Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях:

1. I-я Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) 8-12 сентября 2013 года, Москва;
2. Научно-практическая конференция «Радиационные технологии: достижения и перспективы развития-2014». 21 – 23 октября 2014г., Ялта;
3. I-я Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов» РАДИОФАРМА-2015, г. Москва, 17-19 июня 2015 г.;
4. Семинар "Дни российской науки. Нано-, био-, информационные, когнитивные технологии». 22-25 сентября, Цахкадзор, Армения.
5. Научно-технический семинар «Производство альфа-эммитеров в РФ и перспективы создания РФП на их основе», г. Обнинск, 28 сентября 2017.
6. Международная научно-практическая конференция «Ядерная медицина и лучевая терапия. Современное состояние и ближайшие перспективы». г. Москва, 7 декабря 2017 г.

По основным материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК и 8 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций.

## **Структура и объём диссертации**

Диссертация выполнена на 138 листе печатного текста и состоит из:

- введения;
- обзора литературных данных;
- главы, посвященной методикам эксперимента и анализа;
- двух глав, посвященных основным результатам работы;
- заключения.

Список цитируемой литературы включает 120 источников. Работа содержит 2 приложения, 39 рисунков, 11 таблиц.

## **Благодарности**

Автор работы выражает благодарность коллегам Отделения изотопных технологий и радиофармпрепаратов Курчатовского комплекса физико-

химических технологий (ККФХТ) НИЦ «Курчатовский Институт» за помощь в выполнении и написании настоящей работы, особенно заместителю руководителя ККФХТ, д-р физ.-мат. наук, профессору Чувилину Д.Ю., начальнику лаборатории радиохимии, канд. физ.-мат. наук Прошину М.А., гл. специалисту Болдыреву П.П., ведущему технологу Курочкину А.В., нач. группы Перминову Ю.А. И сотрудникам других подразделений – Бобкову А.В. и Яшину Ю.А.

Также благодарность автор выражает Дееву С.М. – руководителю Лаборатории молекулярной иммунологии, чл.-корр. РАН, д-р биол. наук, профессору (Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН) и Головаченко В.А. (ООО «Технология медицинских полимеров» (Санкт-Петербург), доктору биологических наук Кармаковой Т.А. (Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена). Отдельную благодарность автор выражает своему научному руководителю Гудевичу Евгению Игоревичу.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации и сформулированы основные цели проведенных исследований, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

**Глава 1 (Получение и использование радионуклидов в ядерной медицине для терапевтического использования)** содержит анализ литературных данных по теме диссертации. Показаны основные способы направленной диагностики и лечения с целью избирательного поражения опухолей и ограничение побочных эффектов воздействия на нормальные ткани. Показаны преимущества применения моноклональных антител (МАТ). Представлен процесс создания радиофармацевтического препарата (РФП), который включает ряд самостоятельных этапов, имеющих свои особенности и соответствующие методические подходы.

Изложенный материал позволяет заключить, что одними из наиболее перспективных терапевтических агентов при терапии онкологических заболеваний считаются короткоживущие  $\alpha$ - и  $\beta$ -излучающие радионуклиды ( $\alpha$ - и  $\beta$ -эмиттеров), такие, как  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  и



др. Заряженные частицы, образующиеся в результате распада радионуклидов, обладают высокой энергией и коротким пробегом в веществе, поэтому при локализации достаточного количества атомов  $\alpha$ - и  $\beta$ -эмиттеров в непосредственной близости от опухолевой клетки достигается их избирательное уничтожение при минимальном повреждении окружающих тканей. Для обеспечения избирательной локализации атомов  $\alpha$ - и  $\beta$ -эмиттеров чаще всего используются антитела к различным опухолевым антигенам (как полноразмерные, так и в виде фрагментов или модификаций), а также лиганды, способные специфически связываться с определенными рецепторами клеточной поверхности.

В диссертации реализован метод получения РФП, общая молекулярная масса которого исключает быстрое выведение препарата из кровотока, предложенный в работе. Этот комплекс включает транспортную платформу в виде человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), гуманизированного мини-антитела, обеспечивающего направленную доставку терапевтического агента к раковым клеткам-мишеням и хелатора, связывающего радионуклид.

В качестве терапевтических радионуклидов выбраны короткоживущие  $\alpha$ -эмиттеры  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  и  $\beta$ -эмиттер  $^{177}\text{Lu}$ .

Связывание радионуклидов в РФП осуществляется с помощью хорошо изученных хелаторов DOTA или DTPA.

**Глава 2 (Методическая часть)** содержит характеристики использованных в работе реактивов и материалов, используемых изотопных генераторов ( $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$ ;  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ ;  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ ), а также методики:

- измерения активности радионуклидов;
- синтеза РФП;
- определения содержания лигандов в препарате;
- определения эффективности меченая белковой платформы;
- расчёта радиохимического выхода радиоконъюгата.

**Глава 3 (Получение радионуклидов)** посвящена получению используемых в работе радионуклидов.

Представлена схема получения смеси изотопов тория  $^{229}\text{Th}$  и  $^{228}\text{Th}$ , состоящая из следующих операций:

- растворение  $^{233}\text{U}$ ,

- экстракция  $^{233}\text{U}$  из раствора,
- реэкстракция  $^{233}\text{U}$  из органической фазы,
- аффинаж раствора тория,
- создание и работа генераторной системы  $^{229}\text{Th}/^{225}\text{Ac}$ ,
- создание и работа генераторной системы  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ ,
- создание и работа генераторной системы  $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$ ,
- создание и работа генераторной системы  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ .

Получаемые растворы с представленных генераторов должны отвечать требованиям пригодности для дальнейшего процесса мечения биологических конструкций. Поэтому они не должны содержать примесных металлов.

Представлена методика работы на генераторе  $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$ , который представляет собой систему для накопления свинца  $^{212}\text{Pb}$ . Приводится описание работы генератора и различные характеристики эксплуатации.

Данная система является удобной в качестве радионуклидного генератора. Большой период полураспада материнского радионуклида  $^{228}\text{Th}$  обеспечивает продолжительный срок службы генератора, а относительно небольшой период полураспада дочернего радионуклида  $^{212}\text{Pb}$  позволяет проводить его смыв из генератора 1 раз в сутки (через 24 часа накопление  $^{212}\text{Pb}$  составляет около 70% от максимально возможного). Таким образом, через генератор необходимо все время пропускать поток воздуха, за исключением момента смыва активности и осушки накопителя от раствора. Это позволяет генератору такого типа накапливать активность практически постоянно.

Также в данной главе приводится описание методики работы на генераторах  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$  и  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ .

Оба представленных генератора выполнены в виде автоматических установок с удаленным управлением для уменьшения дозовых нагрузок на персонал.

В представленных результатах испытаний и эксплуатации  $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ -генератора показано, что при смыве с  $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$  генератора степень смыва свинца с фторопластового накопителя составляет от 60 до 65%.

Количество свинца, который элюируется с сорбента одновременно с висмутом (радионуклидная примесь) не превышает 0,02% от общей активности, что является довольно низкой величиной. Причем, при

изменении скорости прокачки раствора через ионообменную смолу, это количество остается постоянным. Поэтому можно утверждать, что примесь свинца практически не зависит от скорости прокачки раствора в данном интервале (от 0,15 мл/мин до 0,86 мл/мин).

В следующем подразделе представлены теоретические аспекты получения лютеция  $^{177}\text{Lu}$ , а также описание методик и результаты выделения данного радионуклида. С учетом достоинств и недостатков обеих представленных схем в данной работе выбрана схема получения  $^{177}\text{Lu}$  высокой удельной активности, основанная на облучении в исследовательском реакторе стабильного изотопа  $^{176}\text{Yb}$  и последующего радиохимического разделения лютеция и иттербия. Разделение металлов проводилось совмещением методов электролиза и цементации.

Представленные теоретические данные позволяют понять процессы, протекающие при окислении и восстановлении радионуклидов  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{176}\text{Yb}$ . Также показана схема ячейки цементации и электролиза (рис. 1).

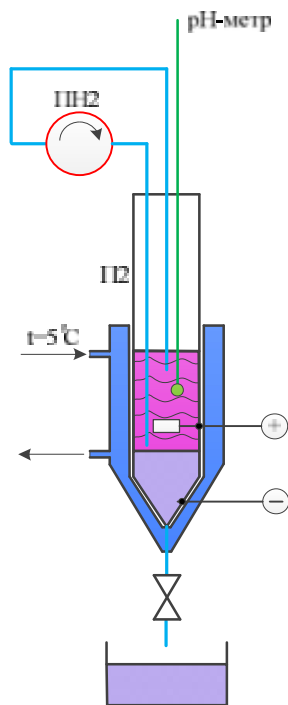


Рисунок 1 - Схема ячейки цементации и электролиза.

Основные элементы: термостатируемый электролизер для проведения процессов цементации и электролиза, перистальтический насос, pH-метр, электроды (анод – Pt, катод – ртутный), сосуд для сбора отработанной ртути и амальгамы.

Представлена технологическая схема разделения  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{176}\text{Yb}$  (рис. 2)

### Технологическая схема разделения.

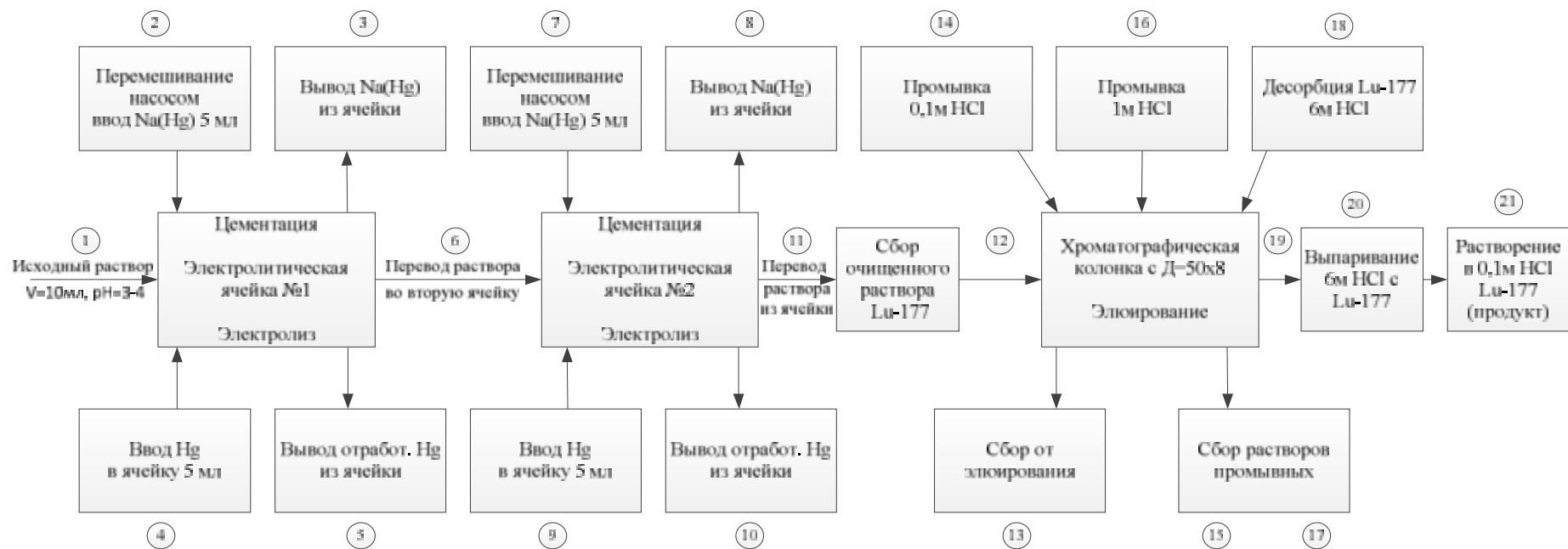


Рисунок 2 – технологическая схема разделения иттербия и лютеция (цифрами обозначена последовательность операций в процессе разделения)

После выделения  $^{177}\text{Lu}$  необходимо очистить от металлических примесей полученный раствор. Разделение проводили на катионообменной колонке, заполненной Dowex 50×8. Раствор  $^{177}\text{Lu}$ , полученный после процесса цементации и электролиза (совмещенного) подавался на колонку длиной 15 см, внутренним диаметром 2,3 мм (объем сорбента составил 0,8 см<sup>3</sup>).

Сорбцию  $^{177}\text{Lu}$  проводили на колонку из всех представленных растворов (сорбция проводится при значении pH меньше 1 солянокислого раствора).

Десорбцию примесей проводили 4 мл 1 М HCl, при этом происходила десорбция основных металлических примесей и буферных систем (ацетат натрия и хлорид натрия).

После этого двумя мл 6 М HCl проводили десорбцию лютеция  $^{177}\text{Lu}$  в виде хлорида. Полученный элюат выпаривали, и сухой остаток растворяли в 0,1 М HCl.

В данной главе изложены оригинальные методы производства радионуклидов  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ . Эти методы реализованы в технологических процессах, которые позволили автоматизировать процедуру производства. Автоматизация (или дистанционное управление) производства радионуклидов необходимо для обеспечения радиационной безопасности персонала.

**В главе 4 (Получение РФП с различными характеристиками)** представлены методы включения радионуклидов в органические молекулы.

Приводится литературный обзор по поведению ионов металлов в различных водных растворах, который включает в себя следующие разделы:

- химия водных растворов висмута,
- поведение ионов висмута в водных растворах,
- виды взаимодействий иона висмута в водных растворах,
- химия водных растворов хлорида висмута.

В следующем подразделе приводится анализ бифункциональных хелатирующих агентов, применяемых при синтезе РФП.

Приводится методика мечения нужными радионуклидами биологической конструкции Me-DOTA(DTPA)-ЧСА-4D5.

В следующем подразделе приводится методика определения параметров, влияющих на выход мечения.

Для разделения компонент растворов в экспериментах использовалась гель-фильтрационная колонка PD MidiTrap G-25, объемом жидкой фазы 1 мл. В паспорте колонки дается калибровка при использовании в качестве буфера изотонического раствора. Биоконъюгат поступал в другом буфере - в растворе MES (2-(*N*-морфолино)-этансульфоновая кислота).

График кривой элюирования ГФК для этих двух растворов, представлен на рисунке 3. Разрешение ГФК (наложение белкового пика и солевого) зависит от наполнителя (размер пор) ГФК и ее величины (объёма).

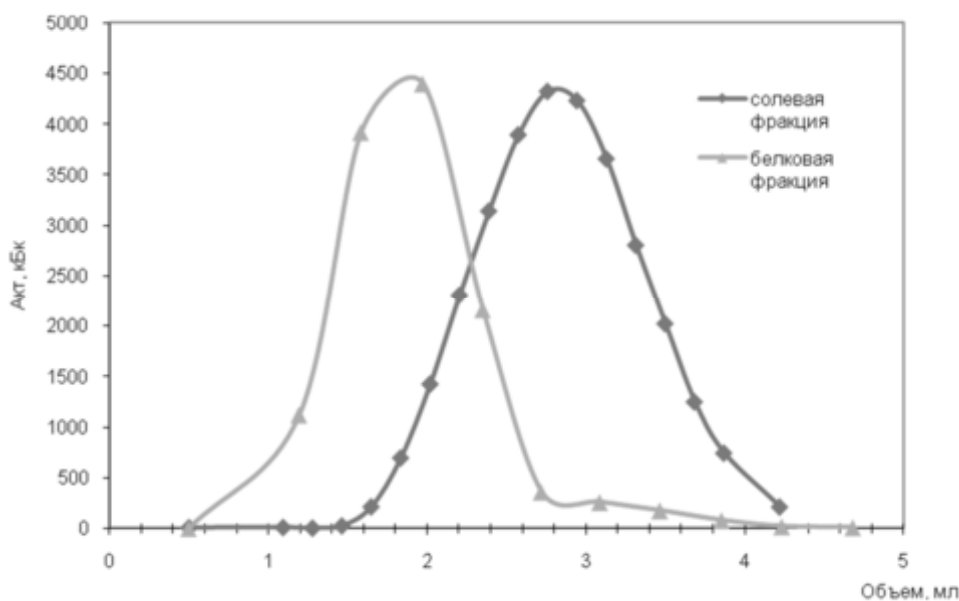


Рисунок 3 – кривая элюирования гель-фильтрационной колонки двух растворов

Для надежности и точности проведения повторяющихся процедур меченая биоконъюгата радионуклидом за время, ограниченное коротким периодом полураспада радионуклида был создан автоматизированный модуль синтеза (МС) с удаленной системой управления. Принципиальная схема МС приведена на рисунке 4.

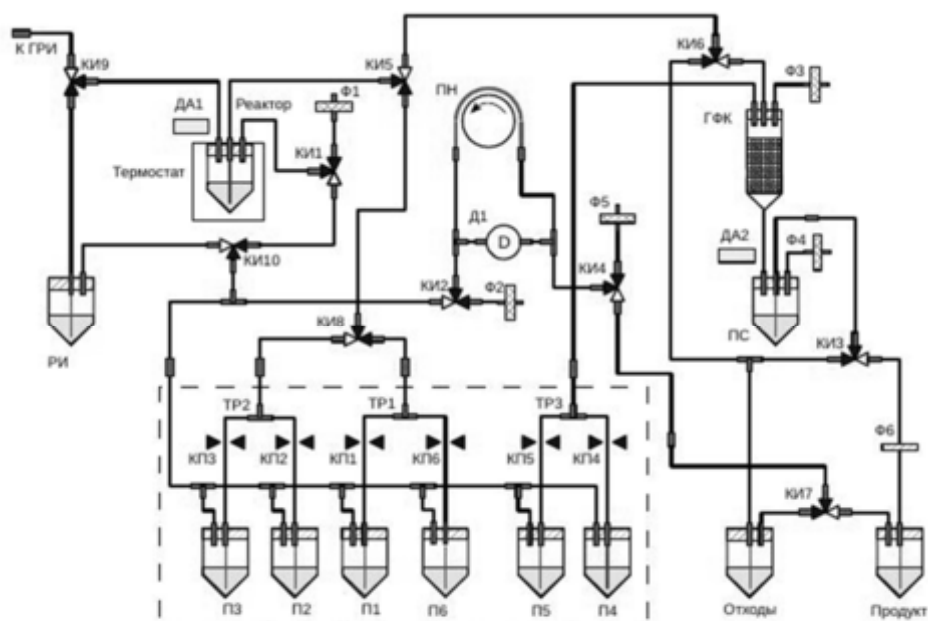


Рисунок 4 - Схема модуля синтеза

*ПН – перистальтический насос, ДА1-ДА2 – датчики активности, Д1 – датчик давления, КИ1-КИ8 – соленоидные клапаны, КП1-КП6 – пережимные клапаны, П1-П6 – флаконы с расходными реактивами; Ф1-Ф5 – воздушные фильтры, Ф6 – стерилизующий фильтр*

После описания методики мечения приводятся экспериментальные результаты, показывающие преимущества буферных растворов при мечении различными радионуклидами (табл. 1).

**Таблица 1.** Результаты экспериментов по получению меченного конъюгата с использованием  $^{212}\text{Pb}$  и  $^{212}\text{Bi}$  в различных буферных системах.

Буферный раствор	Объем, мкл	Концентрация, М	рН	Выход мечения, %			
				ДТРА-Bi	ДОТА-Bi	ДТРА-Pb	ДОТА-Pb
Цитратный	50	1	4,5	82	-	84	-
Цитратный	50	1	4,5	-	30	-	30
Цитратный	4	1	4,5	-	54	-	84
Ацетатный	50	1	4,7	-	84	-	88
Ацетатный	50	1	4,7	82	-	53	-
Фосфатный	50	1	5,3	-	88	-	85
Фосфатный	50	1	5,3	96	-	88	-

Разработанные методики мечения конъюгата 4D5-ЧСА-DTPA радионуклидом  $^{212}\text{Bi}$ , а также другими радионуклидами позволяют получить радиохимический выход мечения более 80 % для различных радионуклидов.

После получения РФП необходимо было изучить его физико-химические свойства. Представленная методика определения стабильности в различных биологических среда показала стабильность разрабатываемого комплекса в течение длительного времени (более 7 суток).

Измерение радиохимической чистоты методом эксклюзионной хроматографии проводили на колонках PD MidiTrap-25 (GE HealthCare). На колонку, предварительно промытую пятью объемами колонки буфером MES (0,02 М 2-N-морфолиноэтансульфоновая кислота, 0.15 М NaCl), наносили 1 мл препарата. Элюировали этим же буфером MES. На выходе из колонки собирали «нулевую» фракцию объёмом 1 мл, целевую фракцию объёмом 1,5 мл и солевую фракцию, объёмом 2 мл. Радиохимическую чистоту исследуемого препарата определяли как отношение активности целевой фракции к исходной активности препарата.

Исследование стабильности проводили в двух различных растворах – физиологическом растворе (0,9% раствор хлорида натрия) и растворе сыворотки крови человека (плазма крови, лишённая фибриногена).

После каждой серии экспериментов строили график зависимости РХЧ препарата от времени выдержки в растворе. На рисунке 5 представлена зависимость изменения стабильности препарата в сыворотке крови человека от времени выдержки.

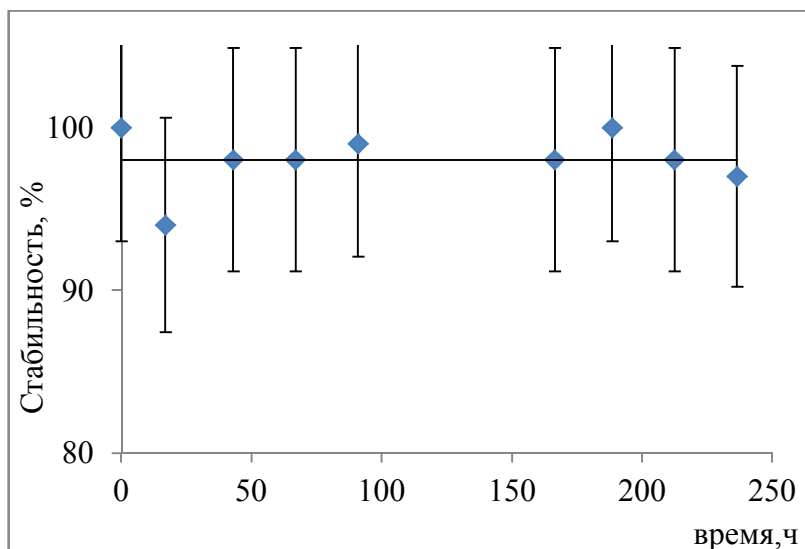


Рисунок 5 - Стабильность биоконъюгата в сыворотке крови человека



Из графика видно, что при выдержке препарата в течение 10 суток деградации комплекса не происходит.

На рисунке 6 показана временная зависимость стабильности препарата в изотоническом растворе.

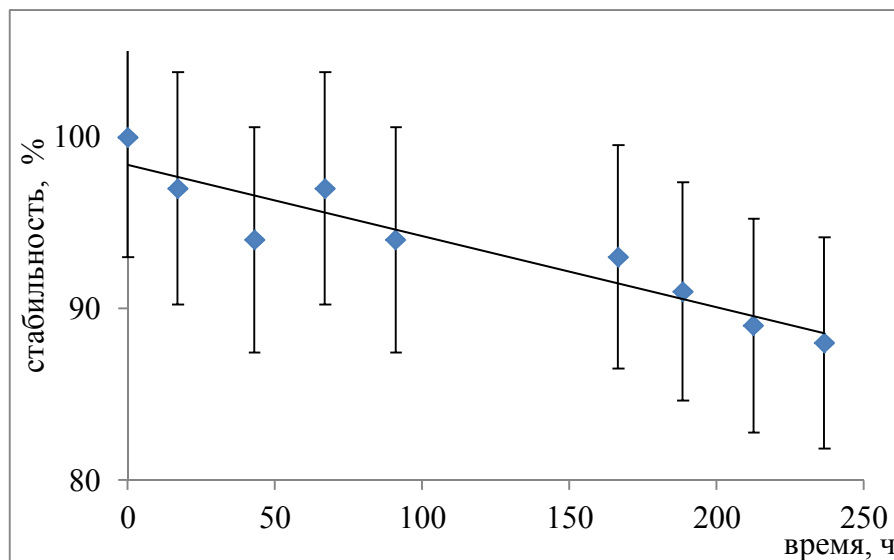


Рисунок 6. Стабильность биоконъюгата в изотоническом растворе

На представленной зависимости видно незначительное разрушение комплекса (менее десяти процентов), что показывает стабильность исследуемого биоконъюгата в изотоническом растворе.

В данной главе содержится разработка и освоение процессов производства радионуклидов и включения (мечение) этих радионуклидов ( $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) в биохимические конъюгаты (МКАТ+бифункциональный хелатирующий агент p-SCN-Bn-DTPA или DOTA-NHS-ester+ЧСА). Эта работа завершает важный этап в создании противоопухолевого РФП таргетного типа с радионуклидом в качестве терапевтического агента и позволяет приступить к проведению предклинических испытаний препарата.

Показана универсальность разработанной белковой конструкции для других изотопов и высокая степень меченя конъюгата. Решение технологических процессов меченя позволили создать автоматизированный модуль синтеза противоопухолевого РФП таргетного типа с радионуклидом в качестве терапевтического агента.

Для проведения биомедицинских испытаний разработанного РФП (стабильность, специфичность, токсичность и др.) необходимо производить

РФП с требуемыми параметрами. В работе содержится описание аналитических методов контроля параметров (качества) конъюгата и радионуклидов и анализа целевого РФП по большому количеству параметров.

### Заключение

1. Разработан оригинальный метод производства изотопов  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  из смеси изотопов Th (содержащей  $^{228}\text{Th}$ ). В предложенном варианте используется особенность цепочки распада  $^{228}\text{Th}$  – вследствие содержания в ней газообразного  $^{220}\text{Rn}$ . Это приводит к разделению радионуклидов при разделении фаз (твердой-газообразной), что обеспечивает высокую радионуклидную чистоту. Технологическая реализация метода (проточный ториевый реактор, трубчатый спиральный накопитель, элюирование растворов снизу вверх) позволило создать автоматизированный генератор  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ . Одной заправки генератора хватает на примерно 10 лет производства целевых изотопов. Оптимальный режим работы генератора: Сорбция  $^{212}\text{Pb}$  один раз в 40-48 часов, работу с  $^{212}\text{Bi}$  проводят в течение нескольких часов с момента элюирования.

Производство  $^{177}\text{Lu}$  основано на методе цементации раствора облученной мишени  $^{176}\text{Yb}$ . Метод существенно модифицирован в связи с малым содержанием  $^{177}\text{Lu}$  в мишени ( $\sim 0,1-0,01\%$ ). В результате переработки мишени разработанным методом удается получить  $^{177}\text{Lu}$  с чистотой не менее 99% и с эффективностью выхода  $\sim 80\%$ .

2. Проведено экспериментальное определение параметров процесса включения радионуклидов  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  в молекулы бифункциональных хелатирующих агентов p-SCN-Bn-DTPA и DOTA-NHS-ester. Для каждой пары (изотоп-конъюгат) определен состав среды, pH, температура и время инкубации. При которых достигается максимальный процент включений (70-85%). Определение процента включения определялось с помощью гель-фильтрационной колонки.

Создание конъюгатов с различными включенными радионуклидами демонстрирует универсальность разработанной биологической наноконструкции, позволяющей включать с ее состав широкий спектр других

медицинских радионуклидов

3. Для соблюдения точности выполняемых операций по приготовления препарата, сокращения времени приготовления и обеспечения радиационной безопасности персонала на основе разработанного метода меченя радионуклидом конъюгата создан и испытан автоматизированный модуль синтеза РФП.

## Список публикаций по теме диссертации

### В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Нуртдинов Р.Ф., Болдырев П.П., Деев С.М., Головаченко В.А., Загрядский В.А., Захаров А.С., Николаев В.И., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю., Яшин Ю.А. Определение выхода мечения и устойчивости комплексов Bi-BSA-DOTA и Bi-BSA-DTPA. Журнал Радиохимия, том 56, номер 2, 2014 г. сс. 165-169.
2. Нуртдинов Р.Ф., Болдырев П.П., Кочеткова Н.Ю., Прошин М.А., Семенов А.Н. Исследование мечения  $\alpha$ -излучающими радионуклидами  $^{212}\text{Bi}$  и  $^{212}\text{Pb}$  биоконъюгата, специфичного к онкомаркеру HER2/neu. Журнал Медицинская физика, вып. 1, 2015 г. сс. 64-70.
3. Нуртдинов Р.Ф., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю. Синтез биоконъюгата на основе  $^{177}\text{Lu}$  для радиоиммунотерапии и исследование его стабильности в физиологических средах. Журнал «Радиохимия», том 58, номер 2, 2016 г, сс. 150-154.
4. Нуртдинов Р.Ф., Болдырев П.П., Курочкин А.В., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю., Яшин Ю.А.. Электрохимический способ получения радионуклида Lu-177 высокой удельной активности. Вестник Моск. Ун-та, серия 2, Химия, 2016 г., том 57, № 3, сс. 184-190.

### Опубликованные тезисы устных и стендовых докладов:

1. Нуртдинов Р.Ф., Болдырев П.П., Деев С.М., Головаченко В.А., Загрядский В.А., Захаров А.С., Николаев В.И., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю., Яшин Ю.А.. Определение выхода мечения и устойчивости комплексов Bi-BSA-DOTA и Bi-BSA-DTPA. I Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) 8-12 сентября 2013 года, Москва.
2. Нуртдинов Р.Ф., Гнидой И.П., Перминов Ю.А., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю. Автоматизированный Генератор Альфа Излучающих Изотопов. Научно-практическая конференция «Радиационные технологии: достижения и перспективы развития-2014». 21 – 23 октября 2014 г, Ялта.
3. Нуртдинов Р.Ф., Болдырев П.П., Гнидой И.П., Перминов Ю.А., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю. Создание прототипа автоматизированной системы для получения конъюгатов с  $\alpha$ -излучателями. Научно-практическая

конференция «Радиационные технологии: достижения и перспективы развития-2014». 21 – 23 октября 2014 г., Ялта.

4. Нуртдинов Р.Ф., Болдырев П.П., Деев С.М., Головаченко В.А., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю. Получение радиофармпрепаратов с  $^{212}\text{Bi}$  на основе моноклонального антитела 4D5. I-я Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов» РАДИОФАРМА-2015, г. Москва, 17-19 июня 2015 г.

5. Нуртдинов Р.Ф., Семенов А.Н., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю. Синтез биоконъюгата на основе Lu-177 для радиоиммунотерапии и исследование его стабильности в физиологических средах. Семинар "Дни российской науки. Нано-, био-, информационные, когнитивные технологии». Доклад: «Синтез биоконъюгата на основе Lu-177 для радиоиммунотерапии и исследование его стабильности в физиологических средах». 22-25 сентября, Армения.

6. Нуртдинов Р.Ф., Коков К.В., Нуртдинов Р.Ф., Перминов Ю.А., Прошин М.А., Чувилин Д.Ю. Генератор альфа-излучающих радионуклидов ( $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ) для ядерной медицины. Научно-технический семинар «Производство альфа-эммитеров в России и перспективы создания РФП на их основе». 28 сентября 2017 г., г. Обнинск.

7. Нуртдинов Р.Ф., Болдырев П.П., Кочеткова Н.Ю., Прошин М.А., Семенов А.Н. Исследование меченя  $\alpha$ -излучающими радионуклидами  $^{212}\text{Bi}$  и  $^{212}\text{Pb}$  биоконъюгата, специфичного к онкомаркеру HER2/neu. Научно-технический семинар «Производство альфа-эммитеров в России и перспективы создания РФП на их основе». 28 сентября 2017 г., г. Обнинск.

8. Нуртдинов Р.Ф., Загрядский В.А., Кармакова Т.А., Коков К.В., Пиоро Р.М., Плютинская А.Д., Прошин М.А., Семенов А.Н., Чувилин Д.Ю. Разработка радиоиммунного фармпрепарата с  $\beta$ -излучающим радионуклидом Lu-177 для терапии злокачественных новообразований. Международная научно-практическая конференция «Ядерная медицина и лучевая терапия. Современное состояние и ближайшие перспективы», 7 декабря 2017 г., г. Москва.