

*На правах рукописи*



**Ильина Екатерина Алексеевна**

**РАЗРАБОТКА РАДИОФАРМПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ  
МЕЧЕННОЙ ТЕХНЕЦИЕМ-99М 5-ТИО-D-ГЛЮКОЗЫ  
ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

05.17.02 – Технология редких рассеянных и радиоактивных элементов

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Екатеринбург – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет».

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор  
**СКУРИДИН Виктор Сергеевич**

Официальные оппоненты: **ЖУЙКОВ Борис Леонидович**,  
доктор химических наук, ФГБУН Институт ядерных исследований Российской академии наук, заведующий лабораторией радиоизотопного комплекса;

**НЕРОЗИН Николай Александрович**,  
кандидат технических наук, АО «Государственный научный центр Российской Федерации – Физико-энергетический институт имени А. И. Лейпунского», заместитель директора Отделения физико-химических технологий – начальник Научно-производственного комплекса изотопов и радиофармпрепаратов;

Ведущая организация: Обнинский институт атомной энергетики – филиал  
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Обнинск.

Защита состоится «28» декабря 2016 года в 17:00 ч на заседании диссертационного совета Д 212.285.09 на базе ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»: <http://lib.urfu.ru/mod/data/view.php?d=51&rid=262968>.

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Семенищев Владимир Сергеевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Своевременная диагностика и выявление злокачественных новообразований на ранних стадиях их развития остается одной из актуальнейших проблем современной медицины. Ежегодно в нашей стране выявляется около 480 тысяч случаев онкологических новообразований. Из них примерно 60% на последних стадиях заболевания, а это значительно снижает возможность их лечения. Так только за 11 месяцев 2015 года смертность от онкологии в России составила 271,7 тысячи человек.

Развитие ядерных медицинских технологий в нашей стране существенно отстает от мирового уровня. По экспертным оценкам, потребность населения России в радиофармпрепаратах (РФП) удовлетворяется не более чем на 1–3%. В связи с этим, разработка инновационных радиофармацевтических препаратов для молекулярной визуализации онкообразований является весьма актуальным направлением.

К числу наиболее перспективных РФП для ранней диагностики злокачественных новообразований относятся меченные радиоактивными изотопами производные глюкозы. Это связано с тем, что в клетках опухоли наблюдается повышенный уровень метаболизма глюкозы по сравнению с нормальными клетками, что приводит к увеличенному ее поступлению в раковые клетки и, соответственно, к повышенному накоплению радиоактивности в этих областях.

В настоящее время в России для диагностики злокачественных опухолей и оценки эффективности противоопухолевой терапии используется в основном РФП на основе производной 2-фтор-2-дезоксид-глюкозы, содержащий позитрон-излучающий радионуклид  $^{18}\text{F}$ , ( $^{18}\text{F}$ -ФДГ). Препарат применяется для проведения позитрон-эмиссионной томографии (ПЭТ). Однако, несмотря на высокую диагностическую информативность этого метода, его широкое применение ограничено высокой стоимостью обследования, а также отсутствием ПЭТ-центров в большинстве регионов страны.

В отличие от ПЭТ, альтернативная возможность повсеместного выявления онкозаболеваний и за более низкую цену могла бы быть реализована методом однофотонной эмиссионной томографии (ОФЭКТ) с использованием имеющихся в стране гамма-камер (более 200 установок) и доступного для медицины радионуклида технеция-99м ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Однако до настоящего времени радиофармпрепараты на основе меченных  $^{99m}\text{Tc}$  производных глюкозы не разработаны и в практической медицине не используются. Поэтому их создание позволило бы существенно увеличить количество диагностических исследований в онкологии и при этом получать информацию по уникальности и достоверности не уступающую ПЭТ-исследованиям. В конечном итоге, это способствовало бы более широкому выявлению злокачественных новообразований на ранних стадиях и снижению демографических потерь населения.

#### **Степень проработанности темы исследования**

Экспериментальные исследования, посвященные синтезу меченных различными радионуклидами производных глюкозы для медицинской диагностики, и их практическому применению проводились в различных странах. В России этой проблемой активно занимается Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Обнинск), а также ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», где проводятся исследования по синтезу меченных  $^{99m}\text{Tc}$  производных глюкозы и, в том числе, была исследована возможность получения меченой  $^{99m}\text{Tc}$  производной 5-тио-D-глюкозы (5-TDG).

Представленная работа была выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (2012-2013 гг.) по теме «Разработка методов получения моносахаридов меченых технецием-99м для диагностики злокачественных новообразований» (№ Госрегистрации НИР 01201270616). Совместно с ООО «Сибнуклон» были проведены работы в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития

научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» по теме «Создание уникальной безотходной технологии производства и разработка инновационной конструкции генератора технеция-99м для ядерной медицины» (№ Госрегистрации НИР 114092940005).

**Цель исследования:** разработка технологии получения радиофармацевтического препарата на основе 5-тио-D-глюкозы меченной технецием-99м для диагностики онкологических новообразований.

**Основные задачи исследования:**

1. Изучение растворимости субстанции 5-тио-D-глюкозы в различных средах с оценкой их пригодности для проведения синтеза меченого препарата.
2. Изучение закономерности восстановления  $^{99m}\text{Tc(VII)}$  в присутствии  $\text{Sn(II)}$  и выбор оптимальной концентрации восстановителя в реакционной смеси для получения меченной технецием-99м 5-тио-D-глюкозы.
3. Выбор систем растворителей (подвижных фаз) для радиохроматографических исследований методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с целью оценки химической и радиохимической чистоты меченого  $^{99m}\text{Tc}$  препарата.
4. Исследование качественного и количественного состава реагентов и условий проведения синтеза 5-тио-D-глюкозы с высоким радиохимическим выходом и радиохимической чистотой (РХЧ) целевого меченого продукта.
5. Разработка технологии изготовления лиофилизированного набора реагентов для получения меченной  $^{99m}\text{Tc}$  5-тио-D-глюкозы, включающая исследование влияния режимов замораживания и вспомогательных веществ на процесс получения и качество создаваемого препарата.
6. Выбор и проверка методик проведения контроля качества препарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » и подготовка проекта Спецификации для наработки его опытных партий.
7. Проведение медико-биологических испытаний синтезированного радиофармпрепарата на экспериментальных животных и исследование его функциональной пригодности.

**Научная новизна** диссертационной работы состоит в том, что в ней впервые:

1. Исследовано влияние восстанавливающего агента (Sn(II)) на процесс мечения 5-тио-D-глюкозы технецием-99м. Установлено, что степень восстановления  $^{99m}\text{Tc}$  возрастает по мере увеличения концентрации в смеси ионов Sn (II). При этом требуемая радиохимическая чистота РФП не менее 95 % достигается в том случае, если содержание ионов Sn (II) в препарате составляет не менее 0,014 мг/мл.

2. Разработан состав реакционной смеси и технологическая схема получения радиофармпрепарата на основе 5-тио-D-глюкозы, включающая стадии лиофилизации смеси компонентов и приготовление препарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ ». Готовый препарат имеет радиохимическую чистоту более 97%, что доказывает его пригодность для проведения медико-биологических испытаний.

3. На экспериментальных животных доказана функциональная пригодность синтезированного радиофармпрепарата на основе меченной технецием-99м 5-тио-D-глюкозы для проведения диагностики в онкологии. Исследования показали, что уровень накопления препарата в опухоли экспериментального животного с привитой карциномой Льюиса(LLC) в среднем составляет 6,5 %, что является достаточным для ее визуализации.

4. Разработаны методы аналитического контроля качества радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ ». Проведена апробация методик качественного и количественного определения основных компонентов в составе лиофилизата: субстанции 5-тио-D-глюкоза, олова дихлорида дигидрата и аскорбиновой кислоты с учетом их взаимного влияния на результаты анализа. Создан проект Спецификации на новый отечественный радиофармпрепарат.

#### **Теоретическая и практическая значимость результатов работы**

В процессе выполнения диссертации разработана технология приготовления лиофилизированного реагента с увеличенным сроком хранения, удобного для последующего приготовления лекарственной формы радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ », методы контроля его качества основных компонентов и

предложен проект Спецификации для наработки опытных партий радиофармпрепарата с целью проведения его последующих доклинических исследований в Томском НИИ онкологии. На экспериментальных животных доказана функциональная пригодность синтезированного радиофармпрепарата на основе меченой технецием-99м 5-тио-D-глюкозы для проведения диагностики в онкологии. Полученные результаты исследований используются на кафедре Прикладной физики (ПФ) Физико-технического института Томского политехнического университета в учебно-педагогической программе по специальности «Медицинская физика». Практическое применение полученных результатов подтверждено Актами о внедрении.

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертационного исследования послужили существующие в мире теоретические и экспериментальные наработки по созданию радиофармпрепаратов на основе производных глюкозы для медицинской диагностики, а также методам контроля их качества и системного анализа результатов.

В работе применялись следующие экспериментальные методы исследований и методики: методики проведения радиометрических измерений, спектрофотометрические методы анализа, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, метод тонкослойной хроматографии, методика потенциометрического измерения рН, современные методы статистической обработки результатов.

Экспериментальные исследования выполнены на сертифицированном научном оборудовании с использованием аттестованных методик в сертифицированных лабораториях.

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

1. Результаты изучения процесса мечения 5-тио-D-глюкозы технецием-99м в присутствии восстанавливающего агента – двухвалентного олова хлорида дигидрата.

2. Качественный и количественный состав реагентов и условия проведения синтеза 5-тио-D-глюкозы меченной технецием-99м.

3. Технология изготовления лиофилизированных наборов реагентов для получения радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ ».

4. Методики аналитического определения основных компонентов синтезированного радиофармпрепарата и проект Спецификации для наработки его опытных партий.

5. Результаты медико-биологических испытаний радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » на экспериментальных животных.

**Личный вклад соискателя состоит** в непосредственном участии в проведении исследований и общей постановке задач; в проведении анализа и статистической обработке полученных результатов; написании статей и докладов; апробации и внедрении результатов исследования в разработку нового отечественного радиофармацевтического препарата.

#### **Степень достоверности результатов**

Результаты исследований, представленные в работе, основаны на опубликованных экспериментальных данных и известных проверяемых закономерностях, полностью соответствуют современным научным представлениям о закономерностях физико-химических процессов. Все экспериментальные исследования в работе проведены на современном уровне с использованием сертифицированного аналитического оборудования и аттестованных методик.

#### **Апробация работы**

Основные результаты исследований, проведенных в данной работе, доложены и обсуждены на Шестой Российской молодежной Школе по радиохимии и радиохимическим технологиям, г. Озерск, 8 – 12 сентября 2014 г; на Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Изотопы: технологии, материалы и применение» Томского политехнического университета, г. Томск, 20 – 24 октября 2014 г, получен диплом третьей степени; на VII Международной научно-практической конференции:



Физико-технические проблемы в науке, промышленности и медицине, г. Томск, 3 – 6 июня 2015 г; на I Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов» Радиофарма-2015, г. Москва, 17 – 19 июня 2015 г; на VIII Всероссийской конференции по радиохимии «Радиохимия-2015», г. Железногорск Красноярского края, 28 сентября – 2 октября 2015 г; на Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева, г. Томск, 13 мая 2016 г.

Имеется 2 акта о внедрении: акт о внедрении результатов диссертационной работы на кафедре Прикладной физики (ПФ) Физико-технического института Томского политехнического университета в учебно-педагогической программе по специальности «Медицинская физика»; акт о внедрении результатов диссертационной работы в производство лиофилизатов в Томском Научно-исследовательском институте Онкологии.

#### **Участие в выставках и конкурсах:**

Всероссийский конкурс «Инженер года-2015» по версии «Инженерное искусство молодых» в номинации «Биотехнология» // Диплом лауреата конкурса. Медаль. Сертификат №16-332 «Профессионального инженера России».

Обладатель стипендии Президента Российской Федерации для студентов и аспирантов образовательных учреждений высшего профессионального образования (высших учебных заведений), достигших выдающихся успехов в учебе и научных исследованиях, 2015 г.

#### **Публикации**

По материалам данной работы было опубликовано 21 научная работа, из них 8 статей в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК, 2 патента РФ на изобретения, тезисы 11 докладов и материалов международных и всероссийских научных конференций.

**Структура и объем диссертации** включает в себя введение, четыре главы, заключение и список литературы; содержит 123 страницы, в том числе 30 рисунков, 15 таблиц, 16 формул, 127 библиографических ссылок и 2 приложения.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** представлена общая характеристика и анализ современного состояния проблемы, аргументирована актуальность выполненных исследований диссертационной работы, сформулированы цели и задачи исследований, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

**В первой главе** приведен аналитический обзор современного состояния проблемы получения и использования радиофармпрепаратов на основе производных глюкозы для диагностики злокачественных новообразований. Использование меченных производных глюкозы за счет их активного участия в процессах метаболизма, протекающих в организме, позволяет осуществлять транспортировку радионуклида до опухолевых клеток и диагностировать их по повышенному уровню накопления радиоактивности в этой области. В отличие от РФП на основе радионуклидов, используемых при ПЭТ-диагностике, которые вводятся в структуру выбранных производных глюкозы в результате реакций нуклеофильного замещения стабильных атомов, синтез меченных  $^{99m}\text{Tc}$  производных глюкозы предполагает создание его координационных связей с лигандами путем введения в их структуру атомов азота или серы. На сегодняшний день в мире таких меченных  $^{99m}\text{Tc}$  радиофармпрепаратов не производят и в клинической практике не применяют. Вместе с тем, РФП на основе технеция-99м могут оказаться намного выгоднее в применении, так как они предполагают использование для проведения диагностики широко распространенных ОФЭКТ-томографов, что, в свою очередь, существенно снижает стоимость обследования. Высокая востребованность короткоживущего технеция-99м для проведения радионуклидной диагностики обусловлена его хорошей проникающей способностью и малым значением экспозиционной дозы. В большинстве случаев для изготовления технециевых препаратов используют наборы реагентов в виде лиофилизатов, которые удобны тем, что имеют большой

срок годности и поставляются в медицинские учреждения в готовом виде, где на их основе проводят приготовление радиофармпрепарата путем смешивания с элюатом технеция-99м. Поэтому разработка РФП на основе производных глюкозы с технецием-99м откроет широкие перспективы для проведения высокоинформативной диагностики онкозаболеваний в регионах страны не располагающих дорогостоящим ПЭТ-оборудованием и, кроме того, позволит существенно снизить стоимость таких диагностических исследований.

Для создания радиофармпрепарата на основе меченной  $^{99m}\text{Tc}$  5-тио-D-глюкозы необходимо подобрать качественный и количественный состав реагентов для получения стабильного целевого продукта с высокой радиохимической чистотой. Разработать технологическую схему приготовления лекарственной формы препарата и методы проведения контроля его качества. Провести испытания функциональной пригодности препарата на экспериментальных животных. Все это и определило цели и задачи данной работы.

**Во второй главе** диссертационной работы приведен перечень и характеристика веществ, материалов и основного оборудования, использованного для проведения исследований по получению радиофармацевтического препарата на основе 5-тио-D-глюкозы, меченной технецием-99м. Представлены методики приготовления исходных компонентов и растворов для приготовления разрабатываемого радиофармацевтического препарата. Описана методика проведения радиометрических измерений активности технеция-99м в пробах, отобранных из исследуемых растворов синтезируемого радиофармпрепарата с целью оценки радиохимического выхода целевого продукта. Приведена методика получения радиохроматограмм с дальнейшим определением радиохимической чистоты препарата и содержания в нем радиохимических примесей. Приведена методика определения рН растворов, которая необходима для контроля кислотности разрабатываемого РФП, предназначенного для внутривенного введения. Представлена методика статистической обработки данных

радиометрических измерений активности  $^{99m}\text{Tc}$  в пробах и других экспериментальных результатов.

В третьей главе диссертации представлены результаты проверки существующих лабораторных методик мечения 5-тио-D-глюкозы технецием-99м. Как показала экспериментальная проверка, при использовании смесей реагентов, приведенных в литературных источниках, выход меченого целевого продукта после приготовления препаратов и их стерилизующей фильтрации через фильтр

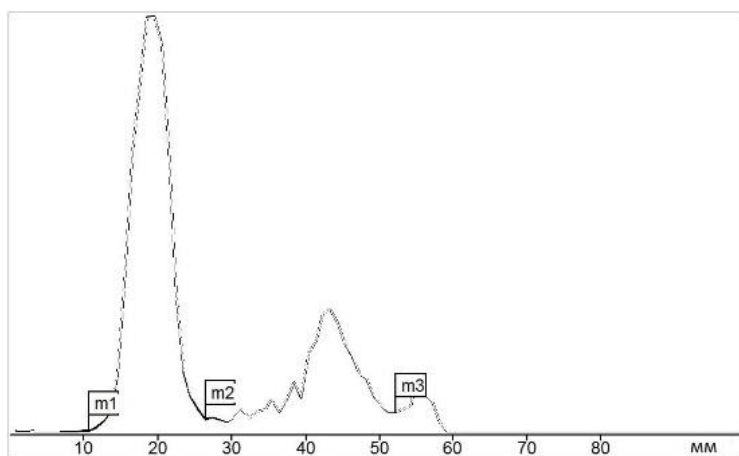


Рисунок 1 – Хроматограмма препарата, полученного по методике, описанной в работах [1, 2]

0,220 мкм не превышает 40 %. К тому же, наблюдается частичное разложение получаемых комплексов в течение 1-2 часов, что говорит о нестабильности и не достаточной пригодности препаратов к практическому использованию в условиях медицинских лабораторий (рисунок 1).

Поэтому основной задачей настоящего исследования явилась разработка технологии получения стабильного набора реагентов для приготовления РФП «5-тио-D-глюкозы,  $^{99m}\text{Tc}$ », который имел бы уровень радиохимической чистоты не менее 95%.

Для этого были проведены исследования по изучению растворимости 5-тио-D-глюкозы в 7 различных средах. По результатам проведенных исследований был сделан вывод, что полное растворение 5-тио-D-глюкозы без образования коллоида наблюдается в воде, физиологическом растворе, 5 % растворе  $\text{NaHCO}_3$  и солянокислом растворе, что предоставляет широкие возможности для проведения в этих средах исследований по введению радиоактивной метки  $^{99m}\text{Tc}$  в структуру 5-TDG.

Далее был исследован процесс восстановления технеция-99м с целью перевода  $^{99m}\text{Tc(VII)}$ , присутствующего в исходном элюате, в более низкое

валентное состояние  $^{99m}\text{Tc(IV)}$ , требуемое для образования координационных связей с 5-TDG. В качестве восстанавливающего агента был выбран дихлорид олова дигидрат. Реакция восстановления  $^{99m}\text{Tc(VII)}$  в присутствии  $\text{Sn(II)}$  схематически может быть представлена следующим уравнением:

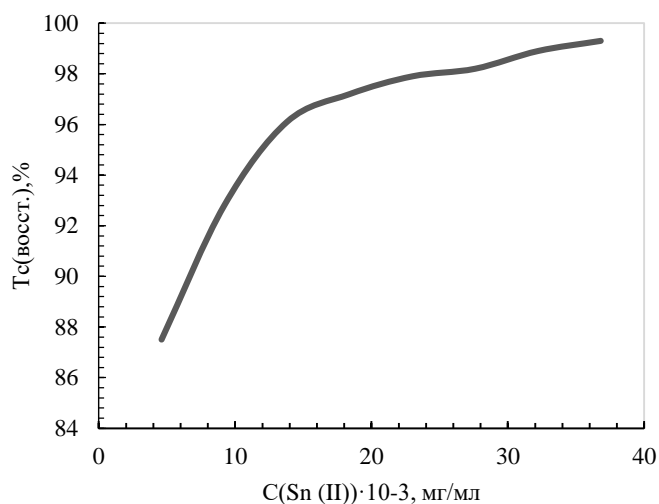
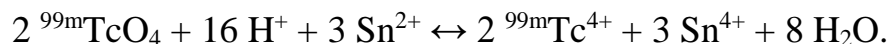


Рисунок 2 – Содержание восстановленного  $^{99m}\text{Tc}$  в зависимости от концентрации ионов  $\text{Sn(II)}$  в растворе

На первой стадии исследований нужно было определить необходимое и достаточное количество ионов  $\text{Sn(II)}$ , требуемое для полного восстановления  $^{99m}\text{Tc(VII)}$  в составе реакционной смеси, поскольку введение в РФП избыточного количества  $\text{Sn(II)}$  может привести к образованию коллоида.

Зависимость изменения содержания восстановленного  $^{99m}\text{Tc}$  от концентрации в растворе ионов  $\text{Sn(II)}$  приведена на рисунке 2. Из нее следует, что по мере увеличения концентрации ионов  $\text{Sn(II)}$  содержание восстановленного  $^{99m}\text{Tc}$  в смеси возрастает. При этом требуемая величина восстановленного продукта не менее 95 % при допустимом содержании радиохимической примеси  $^{99m}\text{Tc(VII)}$  - 5 % достигается в том случае, если количество ионов  $\text{Sn(II)}$  в растворе составляет не менее 0,0138 мг/мл.

Для оценки качества метки исходной субстанции 5-TDG и радиохимического выхода целевого продукта были проведены эксперименты по подбору состава подвижных фаз для радиохроматографических исследований получаемого РФП и продуктов его синтеза.

Так исследования по изучению растворимости 5-тио-D-глюкозы показали, что эта субстанция в ацетоне («АЦ») не растворяется. Об этом свидетельствует хроматограмма, приведенная на рисунке 3, где пятно 5-TDG располагается на

линии старта. Отсюда был сделан важный вывод, что 5-TDГ не препятствует определению в реакционной смеси примеси непрореагировавшего  $^{99m}\text{Tc(VII)}$ , пик которого в среде ацетона перемещается по хроматограмме вместе с фронтом растворителя.

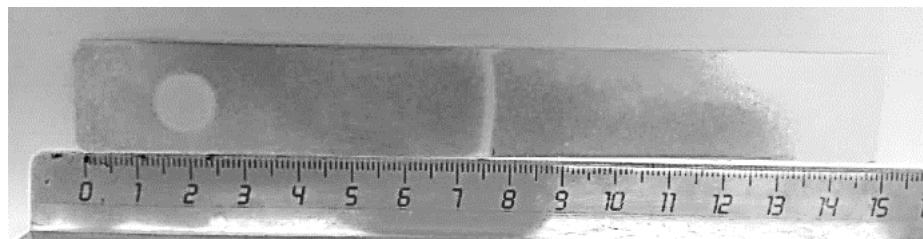


Рисунок 3 – Фото хроматограммы 5-тио-D-глюкозы в «АЦ»

Вместе с тем, было установлено, что субстанция хорошо растворима в хроматографической смеси  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{NH}_4\text{OH} : \text{H}_2\text{O} \div 2 : 5 : 5$ , что позволяет ее использовать в качестве подвижной фазы для проведения анализа продуктов меченая 5-тио-D-глюкозы наряду с ацетоном.

Хроматограмма субстанции 5-TDГ в приведенной смеси на основе этанола («ЭТ») показана на рисунке 4.

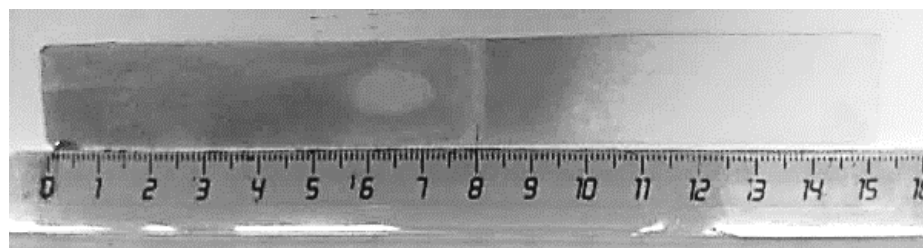


Рисунок 4 – Фото хроматограммы 5-тио-D-глюкозы в смеси «ЭТ»

Из представленной хроматограммы следует, что субстанция 5-TDГ перемещается в среде «ЭТ» вместе с фронтом растворителя, и здесь отдельно следует отметить, что в этой подвижной фазе на линии старта остаются восстановленный  $^{99m}\text{Tc(IV)}$  и его оксид  $^{99m}\text{TcO}_2$ , что также позволяет проводить определение этих радиохимических примесей в РФП.

С учетом всех полученных предварительных результатов была проведена последующая разработка качественного и количественного состава смеси реагентов для проведения синтеза препарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ ». Для выявления необходимых и достаточных количеств содержания в реакционной смеси основной субстанции и восстанавливающего агента Sn(II) была проведена

серия экспериментов в широком диапазоне изменения концентраций 5-тио-D-глюкозы. Параллельно с этим проводилось определение предельно допустимого содержания в составе реакционной смеси двухвалентного олова дихлорида дигидрата, а также стабилизирующего агента аскорбиновой кислоты.

Оптимальными результатами проводимых экспериментов считались следующие: содержание радиохимических примесей невосстановленного  $^{99m}\text{Tc(VII)}$ , а также непрореагировавшего  $^{99m}\text{Tc(IV)}$  и его оксида  $^{99m}\text{TcO}_2$  в полученном РФП не должно превышать 5 % от исходной активности введенного технеция-99м; радиохимический выход (РХВ) меченого препарата должен быть не менее 90 %.

Как показал эксперимент, лучшие результаты по всем приведенным показателям были достигнуты для следующего состава реакционной смеси: [15 мг 5-тио-D-глюкозы + 0,175 мг  $\text{SnCl}_2$  + 0,5 мг АК + 200 мкл 0,05М  $\text{HCl}$ ]. Полученный при ее взаимодействии с элюатом технеция-99м препарат имел величину выхода меченого продукта 91,07 % и радиохимическую чистоту (РХЧ) – 98,6 %, что вполне соответствуют нормативным требованиям. Однако, последующая проверка стабильности полученного РФП показала, что уже через 90 мин после приготовления величина его РХЧ снизилась до 81 %, а через 120 мин – до 68 %. Соответственно возросло и содержание в нем радиохимической примеси  $^{99m}\text{Tc(VII)}$ : до 19 % через 90 мин и до 31 % через 120 мин (рисунок 5).

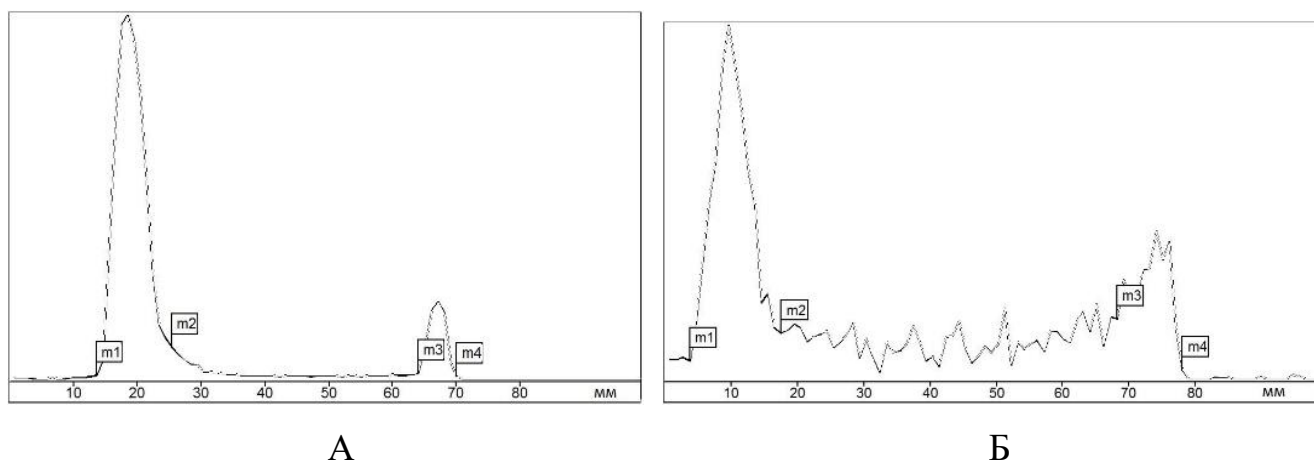


Рисунок 5 – Сравнительные хроматограммы смеси через 90 мин (А) и 120 мин (Б) после приготовления РФП.

В этой связи была исследована возможность повышения стабильности разрабатываемого препарата за счет проведения предварительной лиофилизации исходной смеси реагентов. Другими словами, была исследована возможность изготовления лиофилизированного реагента для получения РФП «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » с большим сроком годности.

С этой целью была сделана оценка влияния на величину радиохимического выхода и радиохимическую чистоту меченого целевого продукта продолжительности процесса лиофилизации. Было опробовано несколько программ, в которых варьировались следующие показатели: время проведения основной сушки, время досушивания в верхней камере, наличие предварительной заморозки исследуемой смеси.

Результаты экспериментов показали, что пробы с предварительной заморозкой имеют низкий процент по обоим показателям, поэтому было решено исключить данный параметр из программы дальнейших исследований.

Зависимости, представленные на рисунке 6, показывают, что с увеличением времени досушивания лиофилизатов до 3,5 часов наблюдается повышение

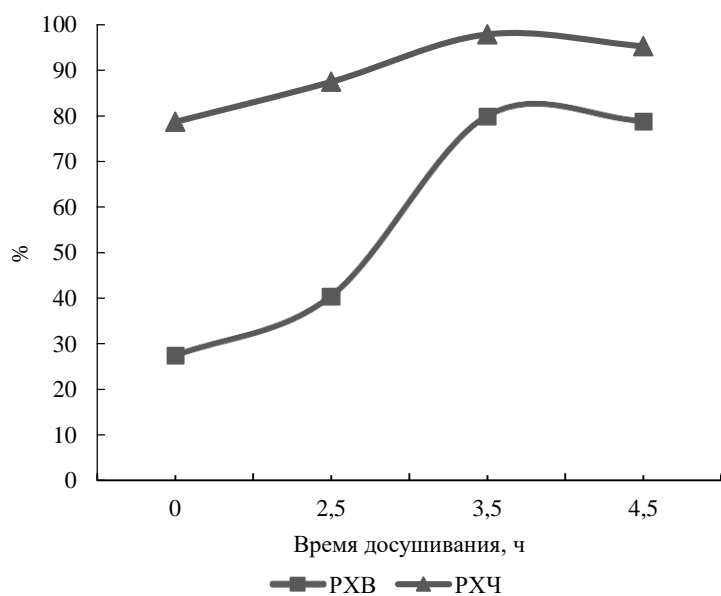


Рисунок 6 – Зависимости изменения РХВ и РХЧ препаратов от времени досушивания лиофилизатов

радиохимического выхода и чистоты, получаемых на их основе РФП. Вероятно, это связано с тем, что при малом времени досушивания не достигается полная сублимация несвязанного растворителя (воды), что может привести к гидролизу ионов двухвалентного олова и переходу в четырехвалентное состояние.



На основании проведенных исследований по разработке оптимального состава препарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » и условий лиофилизации реагента для его получения, была произведена наработка опытных партий РФП с целью проведения контроля их качества и изучения функциональной пригодности по следующей схеме: во флаконы вместимостью 10 мл вводили по 1 мл водного раствора 5-тио-D-глюкозы, содержащего 15 мг субстанции, с последующим доведением pH среды 0,05 М раствором HCl (200 мкл) до значения 4,5. Затем во флаконы добавляли по 25 мкл свежеприготовленного раствора  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (концентрация 7 мг/мл) и 50 мкл раствора аскорбиновой кислоты (концентрация 10 мг/мл). Флаконы с приготовленной смесью помещали в нижнюю камеру лиофилизатора с автоматически заданными параметрами:  $T = -50\text{ }^\circ\text{C}$  и уровнем вакуума  $P = 0,2\text{ Па}$ , процесс сушки проводили в течение 24 ч. Затем смеси досушивали в верхней лиофильной камере при том же режиме в течение 4 ч. Для приготовления препарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » в полученные лиофилизаты вводили по 4 мл элюата  $^{99m}\text{Tc}$  с активностью 1,0–1,5 ГБк с последующей инкубацией смесей при комнатной температуре в ультразвуковой ванне в течение 30 мин. По окончании процесса из флаконов отбирали пробы препаратов объемом 5 мкл для хроматографирования и радиометрических измерений. Получаемый в результате выполнения такой последовательности операций РФП «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » имеет объем 4 мл и состав, приведенный в таблице 1.

Таблица 1 – Состав РФП «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » на флакон

Вещество	Содержание
Технеций-99м	1120-2000 МБк
5-тио-D-глюкоза	15 мг
Олово хлорид дигидрат	0,140-0,175 мг
Аскорбиновая кислота	0,5 мг
Соляная кислота	Концентрация 0,0025 М
Натрия хлорида (ФС.2.2.0014.15)	до 36,0 мг
Вода для инъекций (ФС.2.2.0019.15)	до 4 мл

Для оценки уровня радиохимической чистоты была сделана радиохроматограмма синтезированного препарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ ».

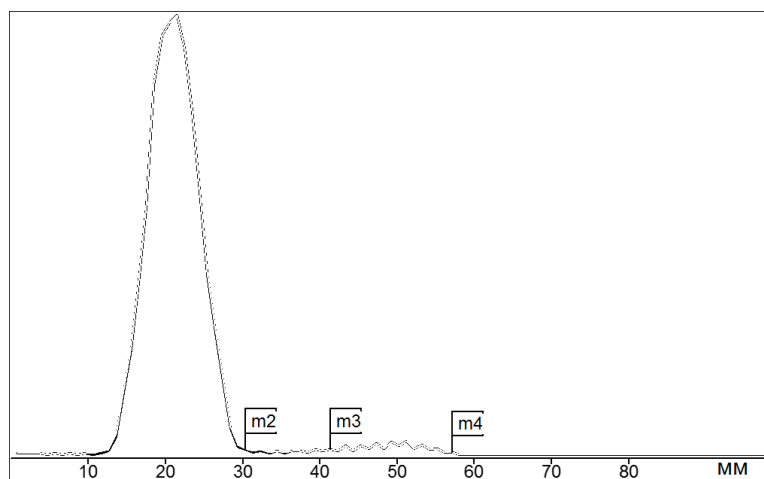


Рисунок 7 – Радиохроматограмма РФП «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ »,  
подвижная фаза – ацетон

Из приведенной радиохроматограммы следует, что радиохимическая чистота препарата превышает 97%, что доказывает его пригодность для проведения медико-биологических испытаний.

**Четвертая глава** диссертации посвящена разработке методов аналитического контроля качества радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » в соответствии с ОСТ «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. № 91500.05.001-00» и ОСТ 42-510-98 «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP)». Проведена апробация методик качественного и количественного определения в составе лиофилизата основных его компонентов: субстанции 5-тио-D-глюкоза, олова дихлорида дигидрата и аскорбиновой кислоты с учетом их взаимного влияния на результаты анализа. Предложен проект Спецификации для наработки опытных партий нового отечественного радиофармпрепарата, как основного раздела при подготовке фармакопейной статьи (ФСП) на производство лекарственного средства.

Для изучения функциональной пригодности препарата «5-тио-D-глюкозы,  $^{99m}\text{Tc}$ » были проведены его испытания на экспериментальных животных с привитой карциномой Льюиса (LLC) на левой задней конечности.

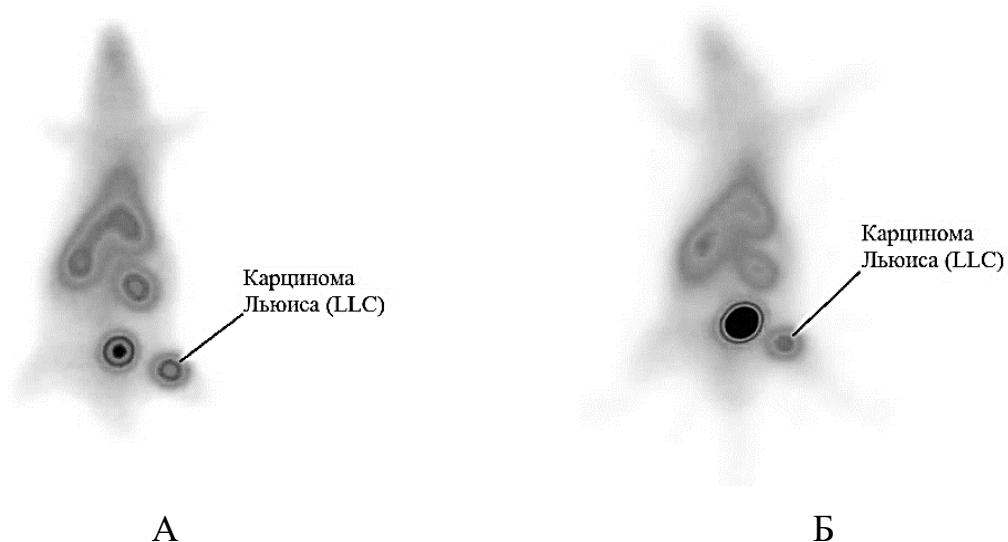


Рисунок 8 – Распределение РФП в организме экспериментального животного через 30 мин (А) и 60 мин (Б) после введения препарата

На полученных сцинтиграммах рисунка 8 отчетливо просматривается область повышенного накопления РФП на бедре левой задней конечности. Здесь, в отличие от правой (здоровой) задней конечности, уровень накопления составляет 6,5 %, что является достаточным для надежной визуализации опухоли.

Полученные результаты удовлетворяют стандартным требованиям к подобным препаратам (6 – 7%), что доказывает функциональную пригодность разработанного препарата.

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная проверка существующих методов мечения технецием-99м 5-тио-D-глюкозы показала недостаточную стабильность получаемых препаратов. Срок их годности не превышает 1-2 часов, вследствие окисления и гидролиза ионов олова, входящего в состав реагентов для получения РФП. Результаты исследования по изучению растворимости 5-тио-D-глюкозы показали, что эта субстанция достаточно хорошо растворима в физиологическом растворе и воде для инъекций, что облегчает задачу разработки и создания на ее основе меченного  $^{99m}\text{Tc}$  радиофармпрепарата для внутривенного введения.

2. При исследовании влияния восстанавливающего агента Sn(II) дихлорида на процесс введения радиоактивной метки  $^{99m}\text{Tc}$  в структуру 5-тио-D-глюкозы было установлено, что степень восстановления  $^{99m}\text{Tc}$  возрастает по мере

увеличения концентрации в смеси ионов Sn (II). При этом требуемая радиохимическая чистота РФП не менее 95 % достигается в том случае, если содержание ионов Sn (II) в препарате составляет не менее 0,014 мг/мл.

3. Проведены эксперименты по подбору состава подвижных фаз для радиохроматографических исследований меченой технецием-99м 5-тио-D-глюкозы и продуктов ее синтеза. Экспериментально установлено, что 5-тио-D-глюкоза перемещается в среде «ЭТ» вместе с фронтом растворителя. Отмечено, что в этой же подвижной фазе вместе с фронтом перемещается и примесь невосстановленного  $^{99m}\text{Tc(VII)}$ , в то время как восстановленный  $^{99m}\text{Tc(IV)}$  и его оксид  $^{99m}\text{TcO}_2$  остаются на линии старта. Напротив, в среде ацетона «Ац» с фронтом растворителя перемещается только примесь невосстановленного  $^{99m}\text{Tc(VII)}$ , а меченая 5-тио-D-глюкоза остается на линии старта.

4. При разработке количественного состава реагента для получения препарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » были определены необходимые и достаточные количества основной субстанции, восстанавливающего агента, а также вспомогательных веществ, обеспечивающих выход меченого целевого продукта более 90 % при его радиохимической чистоте не хуже 95 %.

5. Разработана технологическая схема приготовления лиофилизата для получения препарата на основе 5-тио-D-глюкозы, включающая стадии подготовки компонентов смеси: растворов 5-тио-D-глюкозы, олова дихлорида дигидрата, аскорбиновой кислоты, соляной кислоты и воды для инъекций; проведение фасовки реагентов во флаконы для лекарственных средств и лиофилизирование смесей. В результате исследования взаимодействия приготовленных лиофилизатов с элюатом технеция-99м получены зависимости радиохимического выхода и радиохимической чистоты меченого целевого продукта от продолжительности и условий проведения процесса лиофилизации.

6. Разработана технология приготовления препарата «5-тио-D-глюкоза,  $^{99m}\text{Tc}$ » и проведен аналитический контроль его качества согласно ОСТ «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. № 91500.05.001-00» по показателям «рН», «Объемная активность»,

«Радиохимическая примесь», «Хранение». Проведена разработка методик качественного и количественного определения в составе лиофилизата основных его компонентов: субстанции 5-тио-D-глюкозы, олова дихлорида дигидрата и аскорбиновой кислоты с учетом их взаимного влияния на результаты определения. Предложен проект Спецификации для наработки опытных партий нового радиофармпрепарата, как основного раздела при подготовке фармакопейной статьи (ФСП) на производство лекарственного средства.

7. Проведены исследования препарата «5-тио-D-глюкозы,<sup>99m</sup>Tc» на его функциональную пригодность, которые показали, что уровень накопления препарата в опухоли экспериментального животного с привитой карциномой Льюиса (LLC) в среднем составляет 6,5 %, что является достаточным для ее визуализации.

#### **Список цитируемой литературы**

1. Chen Y., Huang Z.W., He L., Zheng S.L. et al. Synthesis and evaluation of a technetium-99m-labeled diethylenetriaminepentaacetate-deoxyglucose complex <sup>99m</sup>Tc-DTPA-DG as a potential imaging modality for tumors // Applied Radiation and Isotopes. – 2006. – V.64(3). – P. 342-347.

2. Chen X., Li L., Liu F., Liu B. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m-labeled deoxyglucose derivatives as imaging agents for tumor // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2006. – V.16(21). – P. 5503–5506.

#### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

*Статьи в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК:*

1. **Ильина Е.А.** Изучение процесса взаимодействия производных глюкозы с радионуклидом технеций-99м / В.С. Скуридин, Е.С. Стасюк, **Е.А. Ильина**, В.И. Чернов, А.А. Нестеров, А.С. Рогов, Г.Б. Слепченко, Д.А. Гановичев, И.В. Чикова // Известия вузов. Физика. – 2013. – Т. 56 – № 11/3. – С.221-227 (0,44 п. л./ 0,1 п. л.)

2. **Ильина Е.А.** Получение меченных технецием-99м производных глюкозы / В.С. Скуридин, Е.С. Стасюк, **Е.А. Ильина**, А.С. Рогов // Известия вузов. Физика. – 2014. – Т. 57. – № 11/2. – С. 221-226 (0,38 п. л./ 0,1 п. л.)

3. **Ильина Е.А.** Получение нового радиофармпрепарата на основе D-глюкозамина меченного технецием-99м / В.С. Скуридин, **Е.А. Ильина**, Е.С. Стасюк, А.С. Рогов, Е.А. Нестеров, В.Л. Садкин, Л.А. Ларионова // Известия вузов. Физика. – 2015. – Т. 58. – № 2/2. – С. 148-152 (0,31 п. л./ 0,1 п. л.)

4. **Pyina Е.А.** Obtaining Technetium-99m-Labeled Glucose Derivatives / A.S. Rogov, V.S. Skuridin, E.S. Stasyuk, **Е.А. Pyina** // Advanced Materials Research: Radiation and nuclear techniques in material science: Scientific Journal. - Vol. 1084. - 2015. - P. 567-571 (0,31 п. л./ 0,2 п. л.)

5. **Ильина Е.А.** Синтез нанокolloидов на основе оксида алюминия / В.С. Скуридин, В.Л. Садкин, Е.С. Стасюк, Н.В. Варламова, А.С. Рогов, Е.А. Нестеров, **Е.А. Ильина**, Л.А. Ларионова // Известия вузов. Физика. – 2015. – Т. 58 – № 2/2. – С. 129-134 (0,38 п. л./ 0,1 п. л.)

6. **Ильина Е.А.** Медико-биологические испытания нанокolloидного радиофармпрепарата на основе меченой технецием-99м модифицированной молекулы ДТРА / В.С. Скуридин, А.С. Рогов, Е.С. Стасюк, Н.В. Варламова, В.Л. Садкин, **Е.А. Ильина**, Л.А. Ларионова // Известия вузов. Физика. – 2015. – Т. 58 – № 2/2. – С. 143-147 (0,31 п. л./ 0,05 п. л.)

7. **Pyina Е.А.** Modified DTPA molecule-based nanocolloid radiopharmaceutical / A.S. Rogov, V.S. Skuridin, E.S. Stasyuk, N.V. Varlamova, E.A. Nesterov, V.L. Sadkin, **Е.А. Pyina** // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. – 2015. - Vol. 303. - №. 3. - P. 1961–1965 (0,31 п. л./ 0,05 п. л.)

#### **Патенты:**

8. Пат. 2568888. Российская Федерация, МПК А61К 47/12, А61К 51/04, А61К 103/10. Способ и состав для получения реагента для радионуклидной диагностики на основе меченой технецием-99м 5-тио-D-глюкозы [Текст] / Чернов В.И., Зельчан Р.В., Тицкая А.А., Синилкин И.Г., Стасюк Е.С., Скуридин В.С., Садкин В.Л., Рогов А.С., Варламова Н.В., Нестеров Е.А., **Ильина Е. А.** заявитель и патентообладатель Томск. ФГБУ "НИИ онкологии" СО РАМН, ФГБОУ ВПО НИ ТПУ. – № 2014126011/15; заявл. 26.06.14; опубл. 20.11.15 Бюл. № 32. – 10 с. : ил.

9. Пат. 2563134. Российская Федерация, МПК А61К 51/12, А61К 31/704, А61К 103/10. Способ приготовления реагента для получения меченного технецием-99м доксорубицина [Текст] / Скуридин В.С., Варламова Н.В., Стасюк Е.С., Нестеров Е.А., Садкин В.Л., Рогов А.С., **Ильина Е. А.**, Чернов В.И., Синилкин И.Г., Зельчан Р.В., Тицкая А.А.; заявитель и патентообладатель Томск. ФГБОУ ВПО НИ ТПУ, ФГБУ "НИИ онкологии" СО РАМН. – № 2014128163/15; заявл. 09.07.14; опублик. 20.09.15, Бюл. № 26. – 6 с.: ил.

***Тезисы докладов на Всероссийских и международных конференциях:***

10. **Пина Е.А.** Receiving radioactive derivatives glucose for diagnosis oncological disease / A.S. Rogov, V.S. Skuridin, E.S. Stasyuk, V.L. Sadkin, **Е.А. Пина** // Book of Abstracts: The seventh Eurasian Conference «Nuclear science and its application». – Baku, Azerbaijan, 2014. – P. 325 (0,06 п. л./0,01 п. л.)

11. **Ильина Е.А.** Получение нового радиофармпрепарата на основе d-глюкозамина меченого технецием-99м / В.С. Скуридин, Е.С. Стасюк, **Е.А. Ильина**, Е.А. Нестеров, А.С. Рогов, В.Л. Садкин // Изотопы: технологии, материалы и применение: сборник тезисов Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов. – Томск: Изд-во ТПУ, 2014. – С. 89 – 90 (0,13 п. л./0,05 п. л.)

12. **Ильина Е.А.** Разработка общих принципов введения радиоактивной метки технеция-99м в производные глюкозы / Е.С. Стасюк, В.С. Скуридин, **Е.А. Ильина** // Физико-технические проблемы в науке, промышленности и медицине: сборник тезисов VII Международной научно-практической конференции. – Томск: Изд-во ТПУ, 2015. – С. 200-201 (0,13 п. л./0,1 п. л.)

13. **Ильина Е.А.** Разработка метода получения нового радиофармпрепарата на основе моносахарида меченного технецием-99м / В.С. Скуридин, Е.С. Стасюк, **Е.А. Ильина**, А.С. Рогов, В.Л. Садкин, Е.А. Нестеров // Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов: сборник тезисов I Международной научно-практической конференции Радиофарма-2015. – Москва, 2015. – С. 50 (0,2 п. л./0,1 п. л.)

14. **Ильина Е.А.** Синтез нанокolloидов на основе оксида алюминия / В.С. Скуридин, В.Л. Садкин, Е.С. Стасюк, Н.В. Варламова, А.С. Рогов, Е.А. Нестеров, **Е.А. Ильина**, Л.А. Ларионова // Изотопы: технологии, материалы и применение: сборник тезисов Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов. - Томск: Изд-во ТПУ, 2014. - С. 83 – 84 (0,3 п. л./0,15 п. л.)

15. **Ильина Е.А.** Медико-биологические испытания нанокolloидного радиофармпрепарата на основе меченой технецием-99м модифицированной молекулы ДТПА / В.С. Скуридин, А.С. Рогов, Е.С. Стасюк, Н.В. Варламова, В.Л. Садкин, **Е.А. Ильина** // Изотопы: технологии, материалы и применение: сборник тезисов Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов. - Томск: Изд-во ТПУ, 2014. - С. 86 - 87 (0,3 п. л./0,15 п. л.)

16. **Ильина Е.А.** Нанокolloидный препарат на основе оксида алюминия, меченого технецием-99м / В.Л. Садкин, А.С. Рогов, **Е.А. Ильина** // Физико-технические проблемы в науке, промышленности и медицине: сборник тезисов VII Международной научно-практической конференции. – Томск: Изд-во ТПУ, 2015. - С. 237 (0,2 п. л./0,1 п. л.)

17. **Ильина Е.А.** Разработка лиофилизата на основе нанокolloида  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> меченого технецием-99м / В.С. Скуридин, В.Л. Садкин, Е. С. Стасюк, Н.В. Варламова, А.С. Рогов, Е.А. Нестеров, **Е.А. Ильина**. // Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов: сборник тезисов I Международной научно-практической конференции: Радиофарма-2015. – Москва, 2015. - С. 62 (0,2 п. л./0,1 п. л.)

18. **Irina E.A.** Complex <sup>99m</sup>Tc-PDA-DTPA for myocardial imaging / E.A. Nesterov, S.I. Sazonova, V.S. Skuridin, S.M. Minin, E.S. Stasyuk, N.V. Varlamova, **E.A. Irina**, A.A. Nesterov, V.I. Otmakhov // Book of abstracts: European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2015. - № 42. – S.: 496. (0,2 п. л./0,1 п. л.)