Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук,
профессор Скуридин Виктор Сергеевич

Томск 2016

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение ..... 4

Глава 1 Методы получения меченных радионуклидами производных глюкозы и их применение для медицинской диагностики ..... 13

1.1 Применение и медико-биологические свойства моносахаридов ..... 13

1.2 Получение и физико-химические свойства радионуклида $^{99m}$Tc ..... 19

1.3 Лиофилизированные препараты в современной ядерной медицине. 26

1.4 Радиофармпрепараты на основе производных глюкозы и перспективы их использования ..... 29

1.5 Выводы по главе ..... 37

Глава 2 Материалы и методы, используемые в исследовании ..... 40

2.1 Характеристика используемых веществ, материалов и оборудования ..... 40

2.2 Методики приготовления исходных компонентов и растворов ..... 43

2.3 Методика проведения радиометрических измерений ..... 46

2.4 Методика получения радиохроматограмм ..... 47

2.5 Методика определения величины pH ..... 49

2.6 Методы статистической обработки результатов ..... 51

2.7 Выводы по главе ..... 53

Глава 3 Разработка технологии получения радиофармпрепарата и лиофилизированного набора реагента на основе 5-тио-D-глюкозы ..... 54

3.1 Выбор основного компонента ..... 54

3.2 Исследование растворимости субстанции 5-тио-D-глюкоза ..... 57

3.3 Выбор восстанавливающего агента для натрия пертехнетата,$^{99m}$Tc . 59

3.4 Выбор систем подвижных фаз для хроматографических исследований 5-тио-D-глюкозы для мечения технецием-99м ..... 64

3.5 Разработка состава реагентов для получения препарата «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» ..... 66

3.6 Изучение влияния процесса лиофилизации на качественные характеристики набора реагентов для получения РФП ..... 71
3.7 Методика приготовления лекарственной формы РФП «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» ..... 74
3.8 Выводы по главе ..... 76
Глава 4 Методы проведения контроля качества РФП «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc» и проведение его лабораторных испытаний ..... 79
4.1 Качественное и количественное определение 5-тио-D-глюкозы ..... 80
4.2 Качественное и количественное определение $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ ..... 84
4.3 Качественное и количественное определение аскорбиновой кислоты ..... 89
4.4 Проект спецификации на РФП «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc» ..... 93
4.5 Проведение испытаний препарата на лабораторных животных..... 97
4.6 Выводы по главе ..... 100
Заключение ..... 102
Список литературы ..... 107
Приложение А Акт внедрения результатов диссертационной работы на кафедре Прикладной физики (ПФ) Физико-технического института Томского политехнического университета в учебно-педагогической программе по специальности «Медицинская физика». ..... 122
Приложение Б Акт внедрения результатов диссертационной работы в производство лиофилизатов в Томском Научно-исследовательском институте Онкологии ..... 123

# Введение

**Актуальность темы.** Эффективность медицинской помощи пациентам с онкологическими заболеваниями зависит от уровня развития и внедрения современных технологий ядерной медицины. С этой точки зрения необходим комплексный подход к своевременному и точному диагностированию на ранних стадиях злокачественных новообразований в сочетании с высокоэффективной «адресной» терапией открытыми радионуклидными источниками.

Своевременная диагностика и выявление злокачественных новообразований на ранних стадиях развития является одной из актуальнейших проблем в онкологии. Согласно данным последнего доклада о состоянии здоровья населения и организации здравоохранения Российской Федерации, смертность от онкозаболеваний в 2014 году составила 15,3 % или 201,1 на 100 тыс. человек [1].

Ежегодно в нашей стране выявляется около 480 тысяч случаев онкологических новообразований. Примерно 60% регистрируемых пациентов выявляются на последних стадиях заболевания, а это значительно снижает возможность их лечения. Так только за 11 месяцев 2015 года смертность от новообразований в России составила 271,7 тысячи человек [2].

Методы ядерной медицины уникальны тем, что они позволяют диагностировать функциональные отклонения жизнедеятельности органов на ранних стадиях заболевания, при этом человек может не чувствовать симптомы болезни. Это помогает обнаруживать значительное количество разнообразных заболеваний до их серьезного развития, что существенно ускоряет процесс начала лечения и увеличивает вероятность полного выздоровления.

В тоже время развитие ядерных медицинских технологий в России существенно отстает от мирового уровня. По экспертным оценкам, потребность населения России в радиофармпрепаратах (РФП) удовлетворяется не более чем на 1–3% [3]. В связи с этим, разработка инновационных радиофармацевтических

препаратов для молекулярной визуализации является весьма актуальным направлением.

Производные глюкозы, меченные радиоактивными изотопами, являются перспективными РФП для ранней диагностики злокачественных новообразований. Это связано с тем, что в клетках опухоли отмечается повышенный уровень метаболизма глюкозы по сравнению с нормальными клетками из-за увеличенного количества транспортеров глюкозы, что приводит к увеличенному ее поступлению в раковые клетки [4, 5].

Существуют различные производные глюкозы, меченные радионуклидами $^{18}F$, $^{11}C$ и др. В настоящее время в России в позитрон-эмиссионной томографии (ПЭТ) для диагностики опухолей, метастазов и оценки эффективности противоопухолевой терапии используется РФП 2-фтор-2-дезокси-D-глюкоза ($^{18}F$-ФДГ), содержащий позитрон-излучающий радионуклид фтор-18 [6–8]. Несмотря на высокую диагностическую информативность ПЭТ с использованием $^{18}F$-ФДГ, широкое применение этого метода ограничено из-за его высокой стоимости, а также из-за отсутствия в стране ПЭТ-центров. Так стоимость одного моноисследования составляет от 35 тыс. рублей [9] и выше в зависимости от исследуемой области, а ориентировочная стоимость строительства ПЭТ-центра составляет около 1 – 1,2 млрд. рублей. В данное время в России реально функционируют около 24 ПЭТ томографов (в Москве, в Санкт-Петербурге, в Челябинске, в Уфе и др.) [10].

Однако, наряду с небольшим количеством ПЭТ центров, в стране существует более 200 ОФЭКТ-центров (однофотонная эмиссионная компьютерная томография), оснащенных гамма-камерами. Наиболее часто используемым радионуклидом для ОФЭКТ является технеций-99м ($^{99m}Tc$). Поэтому разработка РФП на основе меченых $^{99m}Tc$ производных глюкозы обеспечит возможность проводить визуализацию опухоли с помощью гамма-камеры, что значительно снизит стоимость диагностической процедуры. При этом использование таких РФП позволит изучать биохимические процессы в

организме на молекулярном уровне и получать информацию по уникальности и достоверности не уступающую ПЭТ-исследованиям. Все это позволит существенно увеличить количество диагностических исследований в онкологии и будет способствовать более широкому выявлению злокачественные новообразования на ранних стадиях развития и снижению демографических потерь, связанных с ухудшением качества жизни и потерей трудоспособности населения от социально значимых заболеваний.

**Степень разработанности темы исследования**

Экспериментальные исследования, посвященные синтезу меченных различными радионуклидами производных глюкозы для медицинской диагностики и их практическому применению, проводились в различных странах [11–15]. 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) [16, 17], а также ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», где проводятся исследования по синтезу меченных $^{99m}$Tc производных глюкозы [18–22] и в том числе была исследована возможность получения меченой $^{99m}$Tc производной 5-тио-D-глюкозы [19].

Представляемая 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 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 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 $^{99m}$Tc(VII) в присутствии 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 $^{99m}$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 $^{99m}$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 проведение контроля качества препарата «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$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 $^{99m}$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, $^{99m}$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, $^{99m}$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, $^{99m}$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 меченной 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 pH, 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 меченной технецием-99м 5-тио-D-глюкозы.

3. Технология изготовления лиофилизированного набора реагентов для получения радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$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,$^{99m}$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 8 – 12 сентября 2014 года в г. Озерск; на Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Изотопы: технологии, материалы и применение» Томского политехнического университета, 20 – 24 октября 2014 года в г. Томск, 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 опубликована 21 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.

# Глава 1 Методы получения меченных радионуклидами производных глюкозы и их применение для медицинской диагностики

## 1.1 Применение и медико-биологические свойства моносахаридов

### 1.1.1 Классификация моносахаридов

Моносахариды представляют собой линейные или замкнутые цепочки, включающие от 3 до 7 атомов углерода, которые имеют гидроксильные, альдегидные или кетонные группы [23, 24]. По строению они относятся к простым углеводам. Глюкоза является представителем группы альдогексоз и существует в двух формах – линейной и циклической. В термодинамическом отношении предпочтительна циклическая форма глюкозы, так как она обуславливает химические свойства глюкозы [25]. Структурные формулы основных представителей групп альдоз и кетоз приведены на рисунке 1.1.

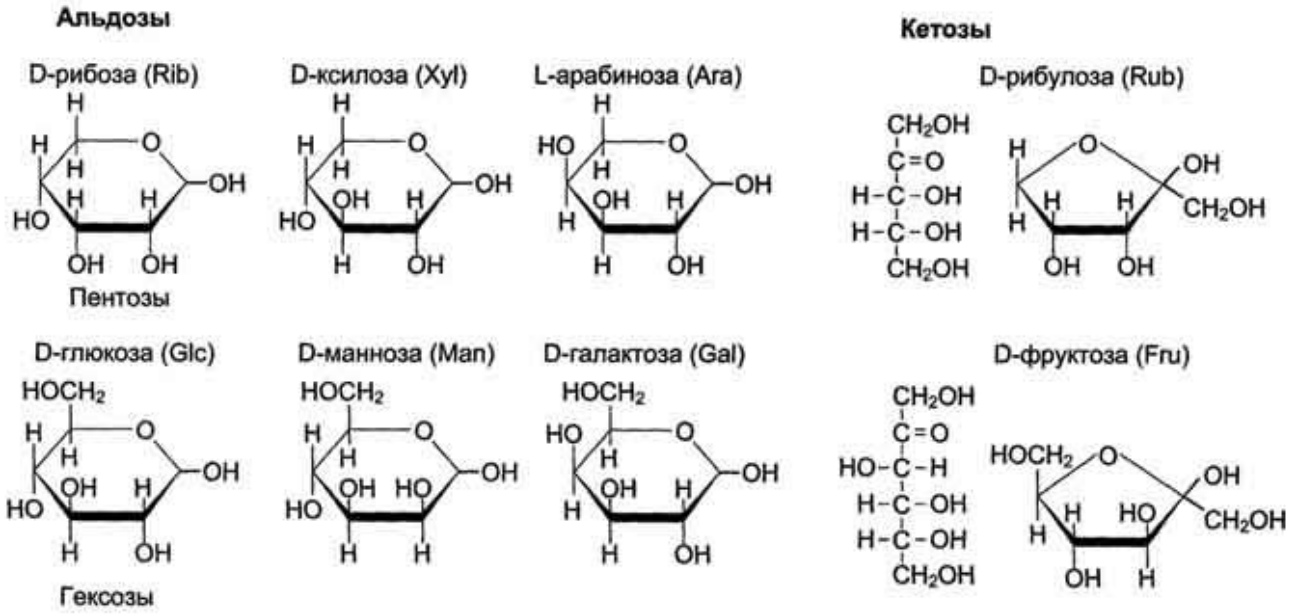



Рисунок 1.1 – Основные представители групп альдоз и кетоз [26]

Глюкоза, как и любая гексоза, имеет четыре углеродных атома, асимметричных друг другу и обусловливающих наличие стереоизомеров. Возможно образование шестнадцати различных стереоизомеров глюкозы, из которых самые важные D– и L– изомеры. Эти изомеры зеркальны друг другу (рисунок 1.2) [27].

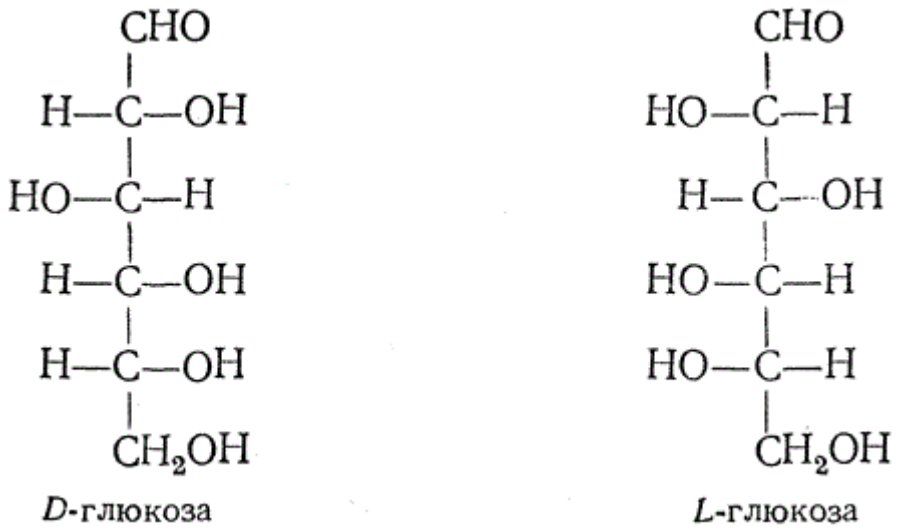
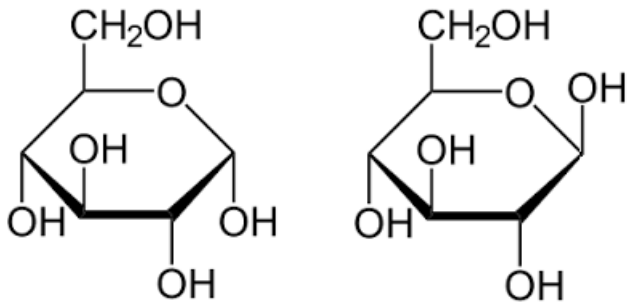



Рисунок 1.2 – Строение D– или L– изомеров глюкозы [26]

Принадлежность глюкозы к D– или L– изомерам определяется расположением H– и OH– групп относительно пятого углеродного атома. В организме моносахариды присутствуют в виде D–изомера, что обусловлено ферментами, катализирующими превращения глюкозы.

Если в растворе моносахарид находится в циклической форме, дополнительно образуются его α⁻ и β⁻ изомеры (рисунок 1.3).




α-D-глюкоза β-D-глюкоза

Рисунок 1.3 – Структура α- и β-аномеров D-глюкозы [26]

Их называют аномерами, которые обозначают определенное положение $H^-$ и $OH^-$ групп относительно атома углерода. У α-D-глюкозы OH-группы располагаются ниже плоскости кольца, а у β-D-глюкозы над его плоскостью [26].

### 1.1.2 Метаболизм производных глюкозы в организме

Различные производные глюкозы являются важными компонентами в организме [28], а именно:

- главной составной частью наружной клеточной мембраны, благодаря чему клетка легко отличает посторонние неклеточные агенты (например, вирусы);
- структурным компонентом основного вещества соединительной ткани, пронизывающей все органы;
- основой хрящей и слизей, защищающих желудочно-кишечный тракт, эпителий бронхов и мочеполовых путей;
- компонентом гепарина, который предотвращает внутрисосудистое свёртывание крови;
- небелковым компонентом некоторых гормонов гипофиза и т.д.

Так как из всех основных углеводов в пище преобладает глюкоза, можно считать, что из всех поступающих в организм углеводов, она является основным продуктом. Остальные моносахариды в процессе метоболизма, могут также превращаться в глюкозу и другие продукты ее метаболизма [26].

Метаболизм углеводов в человеческом организме проходит по следующим схемам [29]:

1. Расщепление поли- и дисахаридов, поступающих с пищей, в желудочно-кишечном тракте до моносахаридов, далее моносахариды всасываются в кровь из кишечника.
2. Гликогенез (синтез гликогена) и гликогенолиз (распад гликогена, в основном в тканях в печени).

3. Гликолиз – распад глюкозы, во время которого обычно происходит образование фруктозодифосфата, глюкозо-6-фосфата и пирувата.

4. Анаэробный гликолиз с прямым окислением глюкозы – пентозный цикл.

5. Гексозное взаимопревращение.

6. Анаэробный метаболизм пирувата, который также может рассматриваться в качестве завершающей стадии: окисление пирувата, хотя этот процесс и не входит в состав углеводного обмена.

В ходе процесса метаболизма глюкозы образуются промежуточные продукты, которые используются для синтеза нуклеотидов, аминокислот, жирных кислот и глицерина [30].

После этого все моносахариды участвуют в клеточном синтезе только в виде фосфорных эфиров. Свободные моносахариды подвергаются фосфорилированию, что приводит к образованию соединений, которые более реакционноспособны по сравнению с другими. Это также может рассматриваться в качестве активационной реакции.

Поступающая в клетки органов и тканей глюкоза сразу подвергается процессу фосфорилирования с использованием АТФ (аденозинтрифосфат) [29]. При образовании в клетке глюкозо-6-фосфата для него срабатывает "ловушка", так как мембрана клетки для фосфорилированной глюкозы становится непроницаема и нет соответствующих транспортных белков. Помимо этого, в цитоплазме процесс фосфорилирования уменьшает концентрацию глюкозы в свободной форме. Вследствие этого диффузия глюкозы из крови в клетки проходит достаточно легко, так как создаются благоприятные условия [26].

Все перечисленное свидетельствует о большой роли глюкозы и ее производных в процессах обмена, протекающих в организме. Также активно осуществляется ее метаболизм и в клетках новообразований.

### 1.1.3 Метаболизм глюкозы в клетках опухоли

Атипизм метаболизма углеводов в опухолях характеризуется рядом особенностей. Наблюдаются проявление, так называемого, феномена «опухоль – ловушка углеводов» (активация реакций транспортировки и утилизации клетками бластомы глюкозы) [31]. При этом в клетках опухоли выявляется три важных закономерности метаболизма глюкозы:

1. В несколько раз возрастает количество включений глюкозы в реакции гликолиза.
2. Проявляется отрицательный эффект Пастера, связанный с увеличением скорости гликолитического окисления глюкозы в присутствии растворенного кислорода [31]. При этом в клетках опухоли начинает интенсивно накапливаться молочная кислота.
3. Прекращается потребление глюкозы в процессе тканевого дыхания при насыщении опухолевых клеток кислородом до10 % и, в лучшем случае, до 50%, в то время как у здоровых клеток этот процесс обеспечивает потребление в нормальном режиме на уровне 80 – 85% [32].

Причинами этих проявлений в метаболизме опухолевых клеток может быть увеличение во внутриклеточной жидкости (цитозоле) активности ферментов гликолиза или повышение в них транспортировки глюкозы.

В связи с этим существенно повышается устойчивость клеток новообразования к гипоксии и гипогликемии и, вследствие этого, увеличивается их выживаемость [33].

Исходя из всего вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что в клетках опухоли отмечается повышенный уровень метаболизма глюкозы по сравнению с нормальными клетками. Из-за увеличенного количества транспортеров глюкозы соответственно увеличивается и ее поступление в раковые клетки. Поэтому велика вероятность накопления в злокачественных новообразованиях и производных глюкозы, меченных радиоактивными

индикаторами, что, в свою очередь, создает перспективы для использования таких РФП для ранней диагностики опухолей и делает актуальными исследования по проведению синтеза новых высокоинформативных препаратов.

На сегодняшний день радиофармпрепараты, применяемые для диагностики опухолей, в соответствии с их свойствами делятся на следующие группы [34]:

1. РФП, которые способны накапливаться в окружающих опухоль тканях, таких как интактные ткани или ткани, подверженные изменениям неспецифического характера со стороны опухоли.

2. РФП, которые проявляют тропность к мембранам клеток опухоли: реакция «антиген-антитело», механизм клеточной рецепции.

3. РФП, проникающие в клетки опухоли: неспецифические и специфические.

РФП 1-ой группы позволяет выявлять наличие опухоли, как область пониженного накопления индикатора. Так, например, $^{99m}$Tc-коллоид, аккумулируясь в Купферовских клетках печени, в норме позволяет получать ее однородное изображение, тогда как для первичной опухоли печени или участков её метастатического поражения характерно появление «дефектов накопления» радиоактивного индикатора, соответствующих локализации новообразования. В качестве других типичных представителей РФП этой группы можно привести пертехнетат,$^{99m}$Tc и изотопы йода ($^{123}$I или $^{131}$I), которые много лет используются для диагностики опухолей щитовидной железы. Эти индикаторы, накапливаясь в тиреоидной ткани, позволяют диагностировать злокачественные новообразования в ней по наличию дефектов аккумуляции РФП. Недостатком такой методики является ее невысокая специфичность, поскольку аналогичным образом, как участки пониженного накопления индикатора, визуализируются кисты железы [34].

В основе диагностического применения в онкологии РФП 2-ой группы лежит реакция взаимодействия меченных моноклональных антител с антигенами мембран раковых клеток. В сцинтиграфической диагностике нашли применения

как целые антитела типа IgG, так и их фрагменты (Fab – fragmentsofantibody). Преимуществом последних является более высокая онкоспецифичность. Однако ускоренный клиренс фрагментов антител из крови за счет более быстрого, по сравнению с большими молекулами иммуноглобулинов выведения почками, может снижать соотношение «опухоль/фон» в злокачественных новообразованиях с обедненным кровотоком. Кроме того, технология получения Fab является достаточно трудоемкой и дорогостоящей [34].

К числу неспецифических РФП относится позитронизлучающий препарат - $^{18}$F-фтордезоксиглюкоза ($^{18}$F-ФДГ), который позволяет с высокой чувствительность выявлять самые разнообразные злокачественные новообразования [35–38].

Применение другого неспецифического позитронизлучающего РФП $^{11}$C-метионина для диагностики опухолей основывается на высоком уровне аминокислотного обмена в активной пролиферации клеток злокачественных опухолей. Этот индикатор используется при выявлении лимфом, злокачественных новообразований шеи и головы.

В последнее время в ядерной медицине стали активно применяться комплексы метокси-изобутил-изонитрила с технецием-99м ($^{99m}$Tc-МИБИ) и тетрофосмином ($^{99m}$Tc-ТФ), благодаря способности этих РФП к усиленной аккумуляции в митохондриях злокачественных клеток. Наиболее активно эти индикаторы используют для выявления рака грудной железы, опухолей легких, лимфом и миеломной болезни [39, 40].

## 1.2 Получение и физико-химические свойства радионуклида $^{99m}$Tc

На сегодняшний день около 100 радионуклидов применяются или могут найти применение в ядерной медицине [41]. В работе авторов Ruth T.J., Pate B.D., Robertson R., Porter J.K. [42] представлен список из 80 радиоизотопов, которые пригодны для проведения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

В радиофармпрепаратах (РФП), используемых для диагностики, излучение радиоактивных изотопов является важным источником информации для проведения измерительного комплекса работ (радиографического, гамма-сцинтиграфического, радиометрического и т.п.), а также проведения визуализация или графической регистрации физиологических процессов, происходящих в отдельных участках тела или исследуемых органах.

Диагностические РФП должны обеспечивать минимальную лучевую нагрузку на критически важные органы и безопасность их введения непосредственно в организм человека. Радиотоксичность РФП в основном зависит от периода полураспада используемого радиоизотопа и степени жесткости его спектра излучения. Исходя из сказанного, используемые для приготовления диагностических РФП радионуклиды должны обладать следующими свойствами:

- Энергия γ-излучения должна находиться в области 50 – 200 кэВ.
- Период полураспада должен быть небольшим (часы или десятки минут) и близким по продолжительности интервалу времени, который проходит от момента введения пациенту РФП до непосредственного проведения измерений [43].
- Распад должен происходить с помощью изомерного перехода или захвата орбитального электрона, который сопровождается испусканием гамма-излучения монохроматического характера.
- При распаде радионуклиды не должны образовывать сопутствующих α-, β- и γ-излучения [44].
- Преобладание процесса фотоэффекта при взаимодействии излучения с материалом исследуемых тканей и органов.
- Получаемая информация должна соответствовать затратам и экологическим последствиям производства радиофармпрепаратов.

Всем перечисленным требованиям наиболее близко соответствует $^{99m}$Tc, который в настоящее время используется для диагностики заболеваний почти

всех важных органов человека. С использованием $^{99m}$Tc или содержащих его препаратов проводится более 80 % всех диагностических процедур в ядерной медицине [45]. Согласно информации, приведенной в публикациях [46, 47], в США ежедневно выполняется 36 000 диагностических тестов, из них 28 000 исследований проводится с препаратами на основе $^{99m}$Tc. В мире эта ситуация характерна для всех развитых стран.

Высокую востребованность $^{99m}$Tc на рынке радионуклидов получил благодаря относительно короткому периоду полураспада (6,02 ч) и низкой энергии гамма-излучения (0,1405 МэВ) [48, 49]. Именно эти свойства обеспечивают малую экспозиционную дозу (0,5–5% от допустимого уровня) и достаточную проникающую способность излучения, которые позволяют проводить радиометрические измерения в медицинских целях. Помимо этого, химические свойства $^{99m}$Tc позволяют получать различные простые и сложные комплексные соединения, которые широко используются в медицине [48].

Технеций-99м является дочерним продуктом β-распада молибдена-99 ($^{99}$Mo), имеющего период полураспада $T_{1/2}$ = 66,02 ч. Его образование происходит по схеме, показанной на рисунке 1.4 [48]:

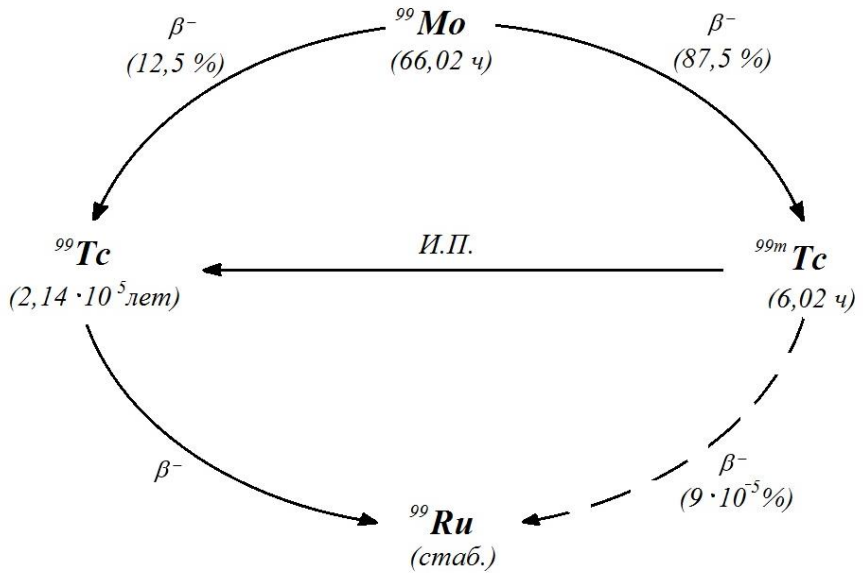



Рисунок 1.4 – Схема $\beta$-распада молибдена-99

В результате β-распада $^{99}$Mo 87,5 % ядер превращается в $^{99m}$Tc, а 12,5 % – в долгоживущий $^{99}$Tc. После этого $^{99}$Tc преобразуется в стабильный изотоп рутения

Для пары $^{99}$Mo/$^{99m}$Tc, используемой в генераторах $^{99m}$Tc, выполняются следующие закономерности [48]:

$$(A_2)_t = \frac{0.875 \cdot \lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1}(A_1)_0\left(e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}\right), \quad (1.1)$$

$$(N_2)_t = \frac{0.875 \cdot \lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1}(N_1)_0\left(e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}\right), \quad (1.2)$$

где $A_1, A_2$ – активности $^{99}$Mo и $^{99m}$Tc; $N_1$,$N_2$ – количества ядер $^{99}$Mo и $^{99m}$Tc; $\lambda_1$ и $\lambda_2$ – постоянные распада $^{99}$Mo и $^{99m}$Tc; $t$ – время распада; $(A_1)_0$ – исходная активность $^{99}$Mo.

Для отделения $^{99m}$Tc от $^{99}$Mo используются специальные устройства, которые называются генераторами технеция [48]. Генераторы, в зависимости от метода разделения, подразделяются на три основных типа: хроматографические (сорбционные) [50, 51], экстракционные [50, 51, 52] и сублимационные [53]. Также существуют установки для получения $^{99m}$Tc, которые сочетают в себе несколько методов [54].

На сегодняшний день генераторы сорбционного типа занимают лидирующие позиции по объему выпуска и применения в мировой медицине. Их компактность и безопасность дают возможность транспортировать их на большие расстояния, от места производства до непосредственно медицинских учреждений. Кроме этого, эти генераторы характеризуются простотой в эксплуатации и стабильным выходом $^{99m}$Tc на уровне 90-95 % (в зависимости от производителя).

Принципиальная схема хроматографического генератора представлена на рисунке 1.5 [48].

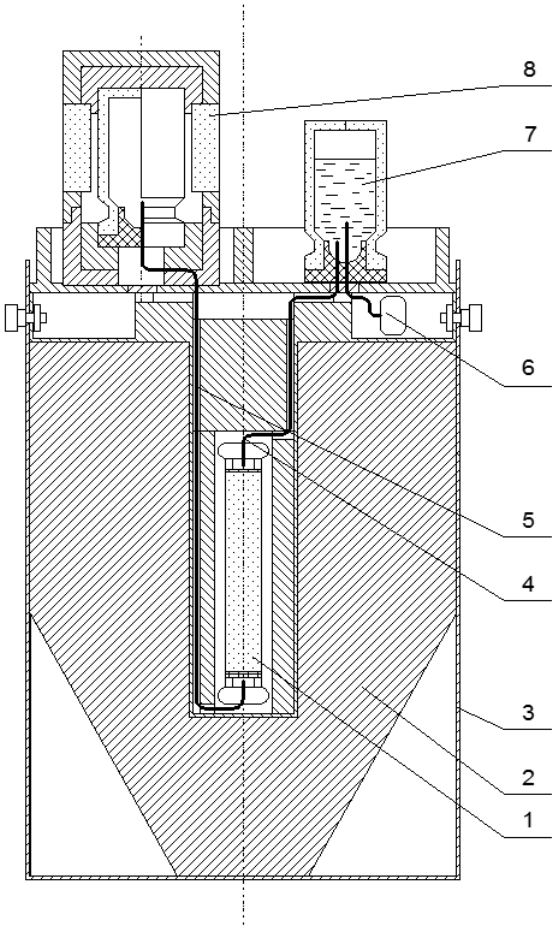



Рисунок 1.5 – Схема сорбционного генератора технеция–99m:
1 – колонка с сорбентом; 2 – биологическая защита от радиационного воздействия; 3 – общий корпус генератора; 4, 5 – линии подачи и отбора элюента; 6 – воздушный фильтр; 7 – флакон с элюентом; 8 – вакуумированный флакон с защитным медицинским контейнером.

Согласно схеме, генератор состоит из хроматографической колонки, заполненной сорбентом (оксидом алюминия), к которой подсоединены коммуникации для подачи элюента и отбора элюата. Все это помещено в защитный контейнер.

Колонку «заряжают» раствором, содержащим молибден–99. Последующее выделение $^{99m}$Tc из генератора осуществляют путем его элюирования – прокачивания через его колонку физраствора (0,9 % раствор натрия хлорида).

Получаемый на выходе продукт представляет собой раствор натрия пертехнетата, $^{99m}$Tc ($Na^{99m}TcO_4$). Более 99 % атомов технеция в этом растворе имеют высшую степень окисления (VII). Использование препарата в диагностике в данной химической форме ограничивается сцинтиграфией щитовидной и слюнной желез. Поэтому на практике, для получения целого ряда $^{99m}$Tc–РФП, раствор натрия пертехнетата смешивают со специальными наборами реагентов. В результате этого образуются различные комплексные соединения $^{99m}$Tc, которые могут селективно накапливаться в тех или иных исследуемых органах.

Поскольку семивалентный $^{99m}$Tc (VII) не склонен к комплексообразованию, его предварительно переводят в степень окисления +IV или +V, это способствует получению его комплексных соединений, а также агрегированных структур со связями Me-Me, оксосоединений и пр. [48]. Сложность процесса перевода технеция в более низкие состояния заключается в выборе и пригодности применяемого восстановителя. Этот перевод осуществляется с помощью относительно слабых восстановителей, например, щавелевая и аскорбиновая кислоты, а также ионов двухвалентного олова, гидразина, гидроксиламина и др. [55–58].

Технеций в четырехвалентном состоянии достаточно устойчив по сравнению с его семивалентным состоянием [56, 59]. Особенно, это касается его хлоркомплексов. Они получаются путем добавления в элюат пертехнетата натрия солянокислого раствора с концентрацией более 1 М. Однако, при меньшей концентрации HCl, в растворе начинает протекать процесс гидролиза. В растворах с нейтральным и щелочным значением pH этот процесс проходит значительно быстрее. В таких растворах Tc (+IV) существует в виде комплексных анионов типа $[Tc(OH)_6]^{2-}$. Восстановление Tc (+VII) до четырехвалентного состояния в солянокислом растворе проходит также и в присутствии аскорбиновой кислоты.

При этом образуется комплекс Tc (IV) с аскорбиновой кислотой. Обратный процесс окисления Tc (+IV) до Tc (+VII) может происходить в присутствии таких соединений, как $H_2O_2$, $MnO_4^-$, $Cl_2$, Ce(IV), а также кислорода на воздухе.

При введении в солянокислый раствор тиоцианат-ионов (молекулярная формула – $SCN^-$) наблюдается восстановление Tc (VII) с образованием тиоционатного комплекса, в котором технеций присутствует в пятивалентном состояния Tc (+V).

Переход Tc (VII) в шестивалентный технеций в виде $TcO_4^{2-}$ наблюдается в присутствии гидроксилоамина. Данный процесс протекает при нагревании раствора до 90°C [58]. При более длительном нагревании наблюдается восстановление Tc (+VI) до Tc (+IV). Шестивалентный технеций может также образовываться и в щелочной среде путем введения в раствор пертехнетата гидразина.

Согласно литературным данным [60], восстанавливающие агенты такие, как гидразин и гидроксиламин, не могут быть применены при производстве медицинских препаратов, в виду своей острой токсичности. Они оказывают негативное влияние на центральную нервную систему, печень и кровь. Тиоцианат-ион также не подходит в качестве восстановителя из-за достаточно агрессивных биологических свойств. При внутривенном введении в организм подавляет работу щитовидной железы и почек [61]. Для восстановления пертехнетата наиболее часто применяется двухвалентное олово ($SnCl_2$), которое отвечает требованиям приготовления медицинских препаратов.

Процесс получения $^{99m}$Tc–РФП в присутствии ионов $Sn^{2+}$ можно приближенно охарактеризовать схемой [48]:

$$^{99m}TcO_4^- + Sn(II)L \xrightarrow{L,\ H_2O} {}^{99m}TC\text{-}Sn\text{-}L + Sn(IV)L \qquad (1.3)$$

Здесь L – вещество для мечения технецием.

Все существующие РФП технеция-99м созданы с учетом его богатой координационной химии. Как правило, они не являются биологическими аналогами присутствующих в организме соединений. Поэтому их биораспределение и уровень накопления в той или иной области во многом зависит от липофильности, размера и заряда синтезированных соединений.

В последние десятилетия направление исследований смещается в сторону разработки РФП прямого действия – меченных $^{99m}$Tc (а также и другими радионуклидами) рецепторных лигандов. Такие меченные биомолекулы выступают средством доставки радионуклида в пораженную область, содержащую значительную концентрацию «целевого» рецептора. Высокая специфичность рецепторного связывания приводит к селективному накоплению меченного лиганда в пораженной ткани и обеспечивает более качественные изображения по сравнению с обычным сцинтиграфическим исследованием.

На сегодняшний день рассматривается три основных пути получения РФП направленного действия [62]. Так называемый *комплексный подход* предполагает создание «искусственного» хелата $^{99m}$Tc с включением в его состав рецепторного лиганда с минимальным изменением размера и сохранением специфичности лиганда. Вместе с тем, при таком подходе заметно снижается эффективность рецепторного связывания меченого соединения с немечеными рецепторами. В качестве второй возможности предлагается *бифункциональный подход*, предусматривающий присоединение хелата радионуклида к рецепторному лиганду, обладающему высокой специфичностью. Предлагается также *смешанный подход*, состоящий в получении макроцикличного металлопептида с повышенной рецепторной связью, содержащего $N_4$, $N_3S$ или донорскую группу $N_2S_2$ [48].

## 1.3 Лиофилизированные препараты в современной ядерной медицине

Проблема получения РФП на основе радионуклидов с коротким периодом полураспада решается в ядерной медицине с помощью создания так называемых

стандартных «реагентов» (лиофилизатов) к генераторам радионуклидов. Они представляют собой стерильные, апирогенные, лиофильно высушенные смеси специально подобранных веществ, которые могут использоваться для проведения эффективной метки тех или иных субстанций при добавлении к ним раствора с радионуклидом. Лиофилизаты имеют длительный срок годности и могут храниться в течение нескольких месяцев.

Как правило, технециевые РФП изготавливаются в виде стандартных наборов реагентов (лиофилизатов) к генератору технеция-99м, приготовленные методом сублимационной сушки [63]. Такие лиофилизированные наборы позволяют осуществлять процесс приготовления РФП непосредственно в клинике незадолго до его введения пациенту [64].

Наборы реагентов, которые используются в клиниках для приготовления РФП технеция, обычно содержат определенные количества восстановителя, а также комплексообразующих (или коллоидообразующих) агентов. В большинстве случаев в состав реагентов входят буферные или стабилизирующие добавки. Обычно срок годности получаемых стандартных наборов составляет 6 – 12 месяцев при соблюдении соответствующих условий их хранения.

С декабря 1991 года в России основным производителем таких наборов является предприятие ООО «Диамед», созданное на базе Отдела радиофармпрепаратов Института биофизики МЗ СССР. На данный момент предприятие производит 11 видов лиофилизатов для приготовления различных РФП [65]. За рубежом подобную продукцию производят фирмы «Amercham», «Malincrodt» и др. Несмотря на это, все еще существует острая необходимость в расширении ассортимента выпускаемых наборов реагентов для диагностики в онкологической области медицины. в онкологии, кардиологии и других областях медицины.

Процесс лиофилизации (от греч. lyo – растворяю и philia – склонность) представляет собой высушивание смесей (растворов) в вакууме при низкой температуре. Сублимационная сушка как метод была предложена в начале XX

века (Altman). Развитие этого метода происходило уже благодаря таким людям, как Шакель (Schackel, 1909), Хаммер [66], Харрис [67] и др.

Лиофилизация широко используется в медицинской промышленности при производстве лечебных, профилактических и диагностических препаратов – вакцин и сывороток, антибиотиков, консервированных препаратов крови (сухой плазмы для переливания, кровезаменителей), а также для создания «банков» сухих препаратов (гомокости, гомокожи, гомососудов), применяемых при хирургических операциях [68, 69, 70]. Лиофилизированные препараты могут сохраняться длительное время; они малочувствительны к колебаниям температуры в процессе хранения, легко переводятся в нативное состояние после введения растворителя (вода, физиологический раствор).

Суть лиофилизации состоит в предварительном замораживании и последующем сублимационном высушивании смесей или препаратов. При замораживании осуществляется консервирование препарата с отверждением жидкой фазы (среды). При этом практически приостанавливаются все биохимические, химические и физические процессы [71].

Сублимационная сушка – это процесс удаления влаги из замороженной смеси или раствора путем возгонки водяного льда, который, минуя жидкую фазу, превращается сразу в пар. Большое преимущество данного метода – это проведение процесса удаления влаги при очень низких температурах, а это в свою очередь является оптимальным условием для сохранения исходных веществ смеси.

Процесс лиофилизации состоит из трех основных стадий: замораживание, основная сушка (сублимация льда), досушивание (удаление связанной влаги при температуре выше 0 °С).

Сублимированные продукты обладают специфической характеристикой – сильно выраженной гигроскопичностью вследствие их пористой структуры [72]. При этом стадия замораживания является очень важной операцией. По ее

окончанию смесь принимает структурный вид, от которого зависят условие сублимации и качество конечного продукта.

## 1.4 Радиофармпрепараты на основе производных глюкозы и перспективы их использования

В 1930 году Отто Варбург обнаружил, что клетки злокачественных новообразований обладают высоким уровнем потребления глюкозы [73], а в 1977 году американский нейрохимик Луи Соколоф предложил измерять уровень метаболического потребления глюкозы с помощью дезоксиглюкозы, предварительно пометив ее радиоактивным изотопом углерода [74]. После в 1979 году Фелпс предложил измерять уровень метаболического потребления глюкозы в мозге [75].

Как уже было отмечено выше, клетки опухоли по сравнению с нормальными клетками, обладают гиперактивным метаболизмом глюкозы и имеют увеличенное количество глюкозоносителей. Поэтому РФП, содержащие глюкозу, меченную радиоактивным изотопом, более интенсивно накапливаются в клетках опухоли, создавая тем самым более высокий уровень радиоактивности в этой области.

На сегодняшний день наиболее часто для выявления разнообразных злокачественных новообразований используется препарат $^{18}$F-фтордезоксиглюкоза ($^{18}$F-ФДГ), на основе позитрон излучающего радиоизотопа фтор–18 ($^{18}$F, $T_{1/2}$ = 109,8 мин). Схема его синтеза представлена на рисунке 1.6 [76].

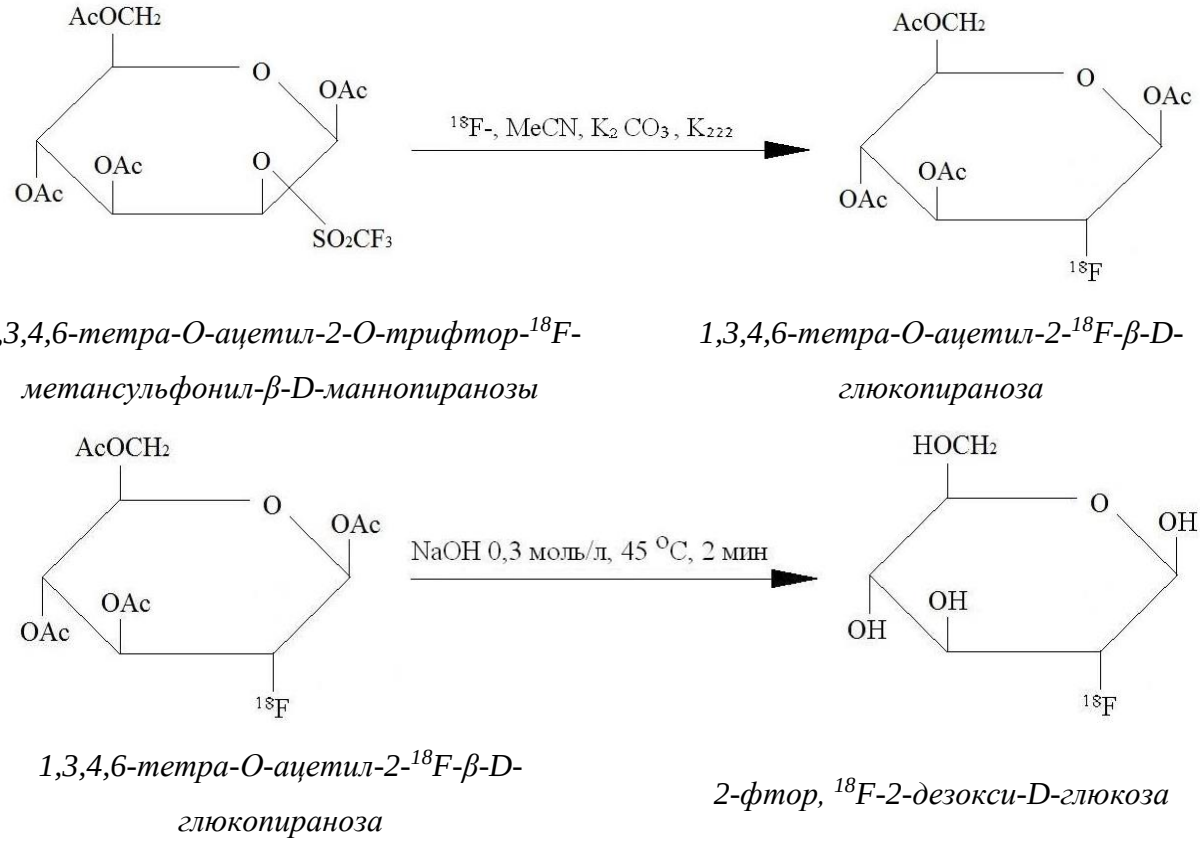



Рисунок 1.6 – Схема нуклеофильного синтеза 2-фтор,$^{18}$F-2-дезокси-D-глюкозы

В основе синтеза РФП лежит нуклеофильное радиофторирование субстрата 1,3,4,6-тетра-О-ацетил-2-О-трифторметансульфонил-β-D-маннопиранозы (ТАТМ) в присутствии межфазового катализатора, циклического аминополиэфира (криптофикса) и карбоната калия. На втором этапе синтеза проводят гидролиз полученной ацетилированной производной глюкозы раствором щелочи.

Перед введением фторид-аниона,$^{18}$F в ТАТМ его предварительно отделяют от мишенной воды на микроколонке, заполненной смолой QMA Accel Waters или другой анионообменной смолой с аналогичными свойствами с последующей десорбцией фторида с колонки смесью ацетонитрил/вода с катализатором криптофиксом.

Реакция замещения трифлатной группы в ТАТМ на ион фтор-18 проводится в растворе ацетонитрила (1 – 2 мл) при температуре 80 $^{0}$C. Радиоактивным

продуктом ее является 1,3,4,6-тетра-О-ацетил-2-$^{18}$F-β-D-глюкопираноза. Гидролиз реакционной массы проводят при щелочном катализе (раствор 0,3 М NaOH) при 40–45 $^{0}$С в течение 2 мин. При этом получается искомый продукт 2-фтор, $^{18}$F-2-дезокси-Д-глюкоза. Все перечисленные химические операции могут быть выполнены с помощью лабораторного робота RB-86 Anatech (Scanditronix, Швеция).

Представленная на рисунке 1.6 схема синтеза используется в лаборатории радиохимии Института мозга человека РАН (Санкт-Петербург).

Чувствительность метода позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием $^{18}$F-ФДГ составляет 88–93%, специфичность – 84–87% [77]. $^{18}$F-ФДГ используется для диагностики рака лёгкого [78], рака головы и шеи [79], головного мозга [80], пищевода [81], шейки матки [82], прямой кишки [83], лимфомы [84]. Вместе с тем, методика синтеза $^{18}$F-ФДГ является достаточно сложной и требует использования специального оборудования, такого как циклотрон, радиохимический модуль или лабораторный робот наряду с ПЭТ-камерой стоимостью 500-600 тысяч долларов.

Еще одним аналогом $^{18}$F-ФДГ с перспективой использования для ПЭТ-томографии является 3-О-метил-D-глюкоза (3-OMG), меченная ультракороткоживущим (УКЖ) радиоизотопом углерод-11 ($^{11}$C, $T_{1/2}$ = 20 мин), которая может быть применена для оценки транспорта глюкозы за счет ее высокого клеточного усвоения [85–88]. Вместе с тем, этот препарат недостаточно удобен для проведения большого количества исследований из-за малого периода полураспада метящего агента.

Несмотря на высокую диагностическую информативность метода ПЭТ с использованием позитрон излучающих радионуклидов, применимость данного метод в практической медицине ограничена вследствие его высокой стоимости, а также относительно небольшого количества ПЭТ-центров. Вместе с тем, в настоящее время в России функционирует достаточно большое количество (более двухсот) ОФЭКТ-центров, где для проведения однофотонной эмиссионной

компьютерной томографии используются гамма-излучающие радионуклиды и, чаще всего, технеций-99м. Поэтому разработка РФП на основе производных глюкозы, меченных более доступными гамма-изотопами $^{99m}$Tc, $^{123}$I, $^{67}$Ga и др., позволила бы проводить визуализацию опухолей с помощью гамма-камер, что значительно снизило бы стоимость диагностических процедур по выявлению онкозаболеваний и сделало такую диагностику доступной для всех регионов страны.

Известны работы [89], где в качестве альтернативы $^{18}$F-ФДГ предлагаются препараты на основе нефторированных производных сахара в апротонном растворителе. При этом термин «нефторированное производное сахара» относится к полисахариду, олигосахариду, дисахариду или моносахариду, в котором одна из групп OH заменена уходящей группой. Указанные нефторированные производные представляют собой подходящие производные моносахаридов, такие как глюкоза, фруктоза, рибоза, арабиноза, манноза или галактоза.

Для описания конкретных нефторированных производных может быть использована формула, приведенная на рисунке 1.7 [89].

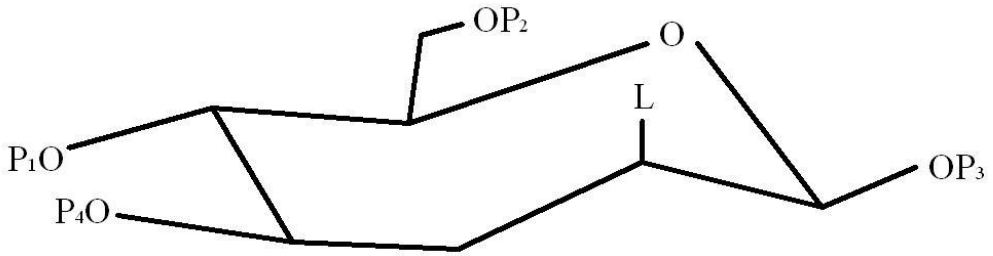



Рисунок 1.7 – Формула нефторированных производных сахаров, где *L* представляет собой уходящую группу, а $P_1$-$P_4$ – подходящую защитную группу.

Выбираемые защитные группы здесь зависят от предполагаемого способа получения фторированного продукта. Так, например, гидроксигруппы могут быть защищены путем превращения в алкиловые или ароматические сложные эфиры при их взаимодействии с ацетилхлоридом или же превращены в простые эфиры,

например, алкиловые или бензиловые. Предпочтительно, если каждая из групп $P_1$-$P_4$ будет представлять собой ацильную группу.

К числу близких нефторированных аналогов $^{18}$F-ФДГ относится меченная йодом-125 производная 6-дезокси-6-йодо-D-глюкоза (6-DIG), используемая для оценки транспорта глюкозы [90]. Этот препарат был получен дезацетилированием метоксида натрия 6-дезокси-6-иод-1,2,3,4-тетра-O-ацетил-D-глюкопиранозы, который является достаточно доступным [91]. Здесь введение в структуру радиоактивного маркера было выполнено путем изотопного замещения стабильного $^{127}$I в молекуле исходной субстанции на его радиоактивный аналог $^{125}$I в соответствии с методом Мэтью и др. [92]. Кратко методика состояла в следующем: 5 мг субстанции 6-DIG было растворено в 1 мл раствора Na$^{127}$I (2 мкл/мл) в ацетоне и затем добавлено к раствору йодида,$^{125}$I натрия в 0,02 М NaOH. Для устранения ацетона смесь нагрели под вакуумом до 105 $^0$C в течение 60 мин. После охлаждения меченый препарат 6 - DIG был растворен в изотоническом растворе NaCl. Количество свободного $^{125}$I в смеси составляло 20 – 30% от общей активности. Для его отделения использовали метод очистки на анионной смоле AG1-X8 (200–400 пор). В последующем с помощью ВЭЖХ было определено, что полученная маркированная глюкоза сохраняет устойчивость в течение, по крайней мере, одного месяца. Аналогичным способом проводилось получение 6-DIG, меченной более короткоживущим ($T_{1/2}$ = 13,3 ч) изотопом йод-123.

В работе [93] проведен синтез и исследовано биологическое поведение еще одного аналога фтордезоксиглюкозы – 2-фторо-2-[$^{123}$I] йодо-маннозы (FIM). После радиоиодирования конечный продукт был устойчив в течение 24 ч, однако в крови мышей наблюдалось быстрое деиодирование $^{123}$I-FIM, обусловленное высокой восприимчивостью к йоду желудка и щитовидной железы. В результате был сделан вывод, что йодированный продукт, в силу своей неустойчивости, не является подходящим метаболическим маркером для проведения исследований в организме.

К такому же выводу пришли и Brunet–Desruet M.-D., Ghezzi C., Morin C. et al. [94] при изучении биологического распределения 2-йод-$^{123}$I-меченных ацетатов D-глюкозы, выбранных в качестве транспортеров радионуклидной метки. Исследование двух синтезированных йодированных ацетата D-глюкозы: 4,6-(R)-O-(2-йодэтилиден)-α,β-D-глюкоза и 4,6-(R)-O-(4-йодбензилиден)-α,β-D-глюкоза показало, что они плохо аккумулируются в клетках и быстро выходят из ткани с предпочтительным выведением через почки.

В работе [95] рассмотрен синтез большого круга производных D-глюкозы, меченных $^{75,77}$Br и $^{123}$I, и сделана оценка их радиохимического выхода.

В отличие от рассмотренных РФП на основе $^{18}$F и $^{123}$I, которые могут быть получены в результате реакций нуклеофильного замещения с лигандом, основные проблемы синтеза производных глюкозы, меченных $^{99m}$Tc, связаны с химическими свойствами этого радионуклида. Обычно такие радиофармпрепараты получают за счет координационной связи $^{99m}$Tc с определенными лигандами, что является гораздо более трудным способом. Поскольку в состав молекулы глюкозы входят только кислород и атомы углерода, то здесь сложно сформировать устойчивую координационную связь с $^{99m}$Tc. Решением указанной проблемы является введение в молекулу производных глюкозы атомов азота или серы. При этом $^{99m}$Tc в степени окисления +5 может здесь выступать в качестве донора электронов и за счет этого образовывать с введенными атомами координационные связи. С учетом того, что $^{99m}$Tc, выделяемый из генератора, имеет степень окисления +7, для образования комплексов с производными глюкозы, имеющими в составе азот или серу, проводят снижение его валентность до +4 или +5, например, с помощью такого восстанавливающего агента, как хлорид олова (II). Принципиальная возможность использования комплексов $^{99m}$Tc с производными глюкозы для визуализации опухоли с помощью гамма-камеры показана в работе [96].

Испытания мечения изотопом $^{99m}$Tc производных глюкозы, содержащих атомы азота и серы, были проведены авторами работы [97]. Предпочтение было

отдано производным: 1-тио-D-глюкозе, 5-тио-D-глюкозе, глюкозамину (рисунки 1.8-1.10), а также их солям и гидратам.

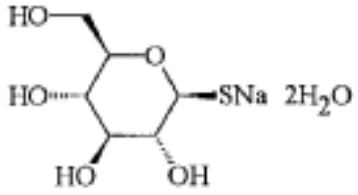



Рисунок 1.8 – Натрия 1-тио-β-D-глюкоза дигидрат

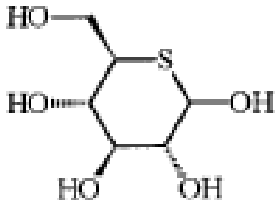



Рисунок 1.9 – 5-тио-D-глюкозы α-аномер

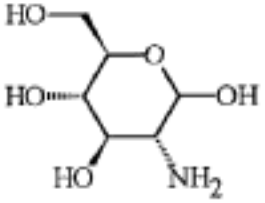



Рисунок 1.10 – D-глюкозамин

Полученные в результате этих исследований меченые $^{99m}$Tc комплексы имели радиохимическую чистоту (РХЧ) 98% и более. Примерно такие же показатели РХЧ были достигнуты в исследовании [98] при смешивании 10 мг 5-тио-D-глюкозы с натрием пертехнетатом, $^{99m}$Tc (1,85 – 3,7 ГБк) в присутствии 0,01 мг хлорида олова (II) и последующей 30-минутной инкубации смеси при комнатной температуре. Испытание полученного препарата на кроликах показали, что его связывание с белками достигает 32 %. Это является благоприятным фактором для обнаружения поражений.

Хорошие результаты получены также в работе [99], где описан процесс введения радиоактивной метки $^{99m}$Tc в структуру диэтелентриаминпентауксусной

кислоты (DTPA) дезоксиглюкозы (DG) и проведено ее предварительное биологическое тестирование (рисунок 1.11). На первом этапе было проведено восстановление $^{99m}$Tc хлоридом олова (II). После восстановленный технеций-99м был добавлен к DTPA-DG и проведено инкубирование смеси при комнатной температуре в течение 30 мин. Проведенные биологические исследования показали, что коэффициент поглощения комплекса $^{99m}$Tc-DTPA-DG опухолью головного мозга у мышей был выше, чем у РФП $^{18}$F-ФДГ. При этом никаких значительных накоплений в других органах замечено не было. При этом наблюдалась быстрая очистка крови через почки [100].

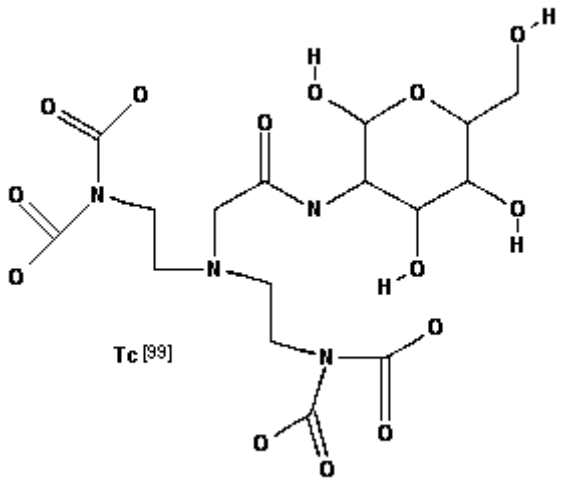



Рисунок 1.11 – (DTPA) дезоксиглюкозы (DG)

Хорошее качество изображений опухолей методом ОФЭКТ наблюдается также при использовании меченого аналога глюкозы $^{99m}$Tc-глюкората [101]. В работе [102] проведено сравнение биологического поведении $^{99m}$Tc-меченных 1-тио-бета-D-глюкозы 2,3,4,6-тетраацетат-аналоговых (Tc-TG) и $^{18}$F-ФДГ. «Привязка» обоих индикаторов была выполнена в пробирках с жизнеспособными опухолевыми клетками и бактериями. Индикаторы за тем вводили в мышцу бедра мышам, инфицированным золотистым стафилококком. Показано, что оба индикатора эффективно связывают опухолевые клетки и обеспечивают высокую

норму накопления в зараженных мышцах. Оба трейсера быстро выводятся из кровеносной системы через почки, преимущественно накапливаясь в мочевом пузыре.

Высокий уровень накопления в инфицированных опухолях животных наблюдался при введении меченного технецием-99м аналога глюкозы $^{99m}$Tc-этилендицестин-дезоксиглюкозы (ECDG), который был получен в результате реакции этилендицестина с глюкозамином в присутствии связующего агента карбодиимида [103].

Попытки разработать научные и технологические основы создания радиофармпрепаратов с использованием производной глюкозы, меченной изотопами технеция-99м и рения-188 предпринимаются в настоящее время в ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» г. Обнинска [16].

Проведенный выше анализ состояния исследований по синтезу меченных радионуклидами производных глюкозы в Российской Федерации и за рубежом показал необходимость в разработке подобных препаратов. Согласно представленным литературным данным, на сегодняшний день в мире диагностические радиофармпрепараты на основе меченных $^{99m}$Tc производных глюкозы не производятся и в клинической практике не используются. Практическая реализация существующих наработок и предлагаемых подходов к проведению их синтеза позволит получить результаты мирового уровня.

## 1.5 Выводы по главе

1. Производные глюкозы активно участвуют в метаболизме не только здоровых, но и опухолевых клеток, поскольку глюкоза является важным компонентом в процессе образования энергии клеток и их питании. Поэтому использование при диагностике меченых производных глюкозы позволит осуществлять транспортировку радионуклида до клеток новообразования и проводить визуализацию опухолей по повышенному уровню его накопления в этой области.

2. Высокая востребованность короткоживущего технеций-99м для проведения радионуклидной диагностики обусловлена его хорошей проникающей способностью при малом значении экспозиционной дозы, а также его химическими свойствами, которые обеспечивают возможность получать различные комплексные соединения, используемые в медицине, в том числе и комплексы с производными глюкозы. Кроме того, РФП на основе технеция-99м намного выгоднее в применении, так как они предполагают использование для проведения диагностики широко распространенных ОФЭКТ-томографов, что, в свою очередь, существенно снижает стоимость обследования.

3. Натрия пертехнетат, выделяемый из генератора технеция-99м, применяется в чистом виде в малом количестве процедур. В большинстве случаев для изготовления технециевых препаратов используют наборы реагентов в виде лиофилизатов, имеющих свойство селективно накапливаться в той или иной исследуемой области. Такие наборы реагентов 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.

4. Исходя из представленного анализа практического использования меченых производных глюкозы для проведения диагностических исследований следует, что на сегодняшний день для этих целей применяются в основном РФП на основе ультракороткоживущих радионуклидов $^{18}F$ и $^{11}C$. Проводится также разработка подобных РФП на основе радиоизотопов йода $^{125}I$ и $^{123}I$. Основной их недостаток состоит в низкой устойчивости, в результате чего часто наблюдается дейодирование меченного продукта при введении в организм. В отличие от этих РФП, которые могут быть получены в результате реакций нуклеофильного замещения стабильных атомов в структуре выбранных для мечения субстанций, синтез меченных $^{99m}Tc$ производных глюкозы предполагает создание его координационных связей с лигандами за счет введения в их структуру атомов азота или серы.

На сегодняшний день в мире такие меченные $^{99m}$Tc радиофармпрепараты не производятся и в клинической практике не используются. Их разработка откроет широкие перспективы для проведения высокоинформативной диагностики онкозаболеваний в регионах страны, не располагающих дорогостоящим ПЭТ-оборудованием.

# Глава 2 Материалы и методы, используемые в исследовании

## 2.1 Характеристика используемых веществ, материалов и оборудования

В ходе экспериментальных исследований были использованы различные вещества и материалы, представленные в таблице 2.1. В таблице 2.2 представлены установки и радиометрическое оборудование.

Таблица 2.1 – Характеристики используемых веществ и материалов

| № п/п | Наименование | ГОСТ, ТУ, страна, фирма | Квалификация или сортность |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | Раствор натрия хлорида 0,9 % для инъекций | ФС 42-2572-95 | Фарм. 8 – 10 г/л |
| 2 | Натрия пертехнетат, $^{99m}$Тс для внутривенного введения | ФГАОУ ВО НИ ТПУ «ФТИ», ТУ 9452-001-02070200 | РХЧ > 99%; |
| 3 | 5-тио-D-глюкоза | Sigma-Aldrich, США | ≥ 98,0% |
| 4 | Кислота соляная | ГОСТ 3118-77 | ХЧ 0,1 М, 2 М, 0,055М. |
| 5 | Этиловый спирт | ГОСТ Р-51-652-2000 | «Высшей очистки», 96 % |
| 6 | Вода для инъекций | ФС 42-2620-97 | |
| 7 | Олово (II) хлорид дигидрат | «Merck», Германия | ХЧ фарм |
| 8 | Аскорбиновая кислота | ФСП 42-0158-5747-04 | |

*Продолжение таблицы 2.1*

| № п/п | Наименование | ГОСТ, ТУ, страна, фирма | Квалификация или сортность |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 9 | Калий рениевокислый (перренат) | ТУ 6-09-04-79-74 | Ч |
| 10 | Калий роданистый | ГОСТ 4139-75 | ЧДА |
| 11 | Квасцы железоаммонийные | ГОСТ 4205-77 | ЧДА |
| 12 | Цитрат натрия трёхзамещённый дигидрат (двуводный) | ТУ 9199-002-01014470-99 | ЧДА |
| 13 | О-фенантролин 1-водный | ТУ 6-09-50-2616-90 | ЧДА |
| 14 | Кислота ортофосфорная | ГОСТ 841-76 | Ч |
| 15 | Пробки резиновые медицинские | ТУ 9398-001-31316292-2007 | Тип 1-1 |
| 16 | Алюминиевые колпачки для укупорки лекарственных средств | ГОСТ 51314-99 | Тип К2-20 |
| 17 | Флаконы из трубки стеклянной для инсулина и антибиотиков | ТУ 9461-025-80007803-2007 | ФО-10-НС-1А |

Таблица 2.2 – Установки и радиометрическое оборудование

| № п/п | Наименование | ГОСТ, ТУ, страна, фирма | Примечание |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2 | Радиометр «Дозкалибратор» РИС-А1 | ООО «НТЦ Амплитуда», Россия | Диапазоны 1 кБк ÷ 40 ГБк |
| 3 | Радиометр активности радионуклидов для ТСХ «ГаммаСкан-01А» | ООО «НТЦ Амплитуда», Россия | Регистрируемая активность 10 кБк ÷ 1 МБк |
| 4 | Спектрофотометр 2802 S UV/VIS UNICO | «Unico», США | Диапазон спектра 190 – 1100 нм |
| 5 | Ультразвуковая ванна «UNITRA» UNIMA OLSZTYN UM-4 | «Unitra», Польша | Ультразвуковая частота 50 Гц |

*Продолжение таблицы 2.2*

| № п/п | Наименование | ГОСТ, ТУ, страна, фирма | Примечание |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 6 | Шприцевые фильтрующие насадки Minisart | «Sartorius», Германия | Размер пор 220 нм |
| 7 | Лиофильная сушка FreeZone 2.5L | «Labconco», США | Объем 2,5 л |
| 8 | Электронные аналитические весы RADWAG WAS 220/c/2 | «Radwag», Польша | До 200 г |
| 9 | Термостолик для ТСХ с подогревом | «Lenchrom», Россия | Максимальная температура, не более 80ºС |
| 10 | Вытяжной шкаф ЛАБ-1200 ШВп | Россия | |
| 11 | Стерилизатор HVA-85 | «Hirayama», Япония | |
| 12 | Полуавтомат для закатки алюминиевых колпачков на флаконах ПЗФ Изотерм | «Изотерм», Россия | Производительность 1000 – 1200 шт./час; |
| 13 | Электроплитка | | Максимальная температура 300ºС |
| 14 | pH-метр/иономер S220 SevenCompact | «Mettler-Toledo», Швейцария | Относительная погрешность pH ± 0,002. |
| 15 | Высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent 1200 | Agilent Technologies, Германия | С рефрактометрическим детектором |

## 2.2 Методики приготовления исходных компонентов и растворов

Для проведения исследований были приготовлены следующие растворы.

***Растворы для приготовления лиофилизированного набора реагента.***

*Раствор $SnCl_2 \cdot 2H_2O$.*

В колбу вместимостью 100 мл вносят навеску олова дихлорида дигидрата ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) массой 0,7 г (точная навеска) и растворяют в 2 мл 1М HCl. По окончании растворения объем доводят до метки кипяченой дистиллированной водой. Растворение проводят в атмосфере инертного газа (аргона). В полученном растворе концентрация олова составит 7 мг/мл. Из-за процесса гидролиза данный раствор готовят непосредственно перед фасовкой.

*Раствор аскорбиновой кислоты.*

В колбу вместимостью 100 мл вносят навеску аскорбиновой кислоты массой 1 г (точная навеска) и проводят растворение в кипяченой дистиллированной воде. После объем раствора доводят до метки той же водой. Полученный раствор будет иметь концентрацию аскорбиновой кислоты 10 мг/мл.

*0,05М раствор соляной кислоты.*

В колбу вместимостью 100 мл вносят концентрированной 36% соляной кислоты (с плотностью 1,189 г/мл) 0,426 мл объем доводят до метки кипяченой дистиллированной водой. В полученном растворе концентрация соляной кислоты составит 0,05М.

***Приготовление растворов, используемых для качественного определения 5-тио-D-глюкозы.***

*Стандартный раствор*: точную навеску 5-тио-D-глюкозы массой 15 мг растворяют в 2 мл дистиллированной воды и затем добавляют 2 мл ацетонитрила.

*Испытуемый раствор:* во флакон с лиофилизатом вводят 2 мл дистиллированной воды, проводят растворение и затем добавляют 2 мл ацетонитрила.

***Приготовление растворов, используемых для количественного определения 5-тио-D-глюкозы.***

*Эталонный раствор*: точную навеску 5-тио-D-глюкозы массой 15 мг растворяют в 4 мл дистиллированной воды (концентрация раствора 3,75 мг/мл).

***Приготовление растворов, используемых для количественного определения олова.***

*2 М раствор хлористоводородной кислоты*: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 17,0 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

*0,006 М раствор калия рениевокислого*: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещают навеску калия рениевокислого массой 0,17 г и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, после полного растворения доводят объем до метки и тщательно перемешивают.

*2 М раствор калия роданистого*: в мерной колбе вместимостью 50 мл помещают навеску калия роданистого массой 9,7 г и растворяют небольшом количестве дистиллированной воды, доводят объем раствора до метки и тщательно перемешивают.

*0,1 М раствор хлористоводородной кислоты*: в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 8,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

*0,9 % раствор натрия хлорида*: в мерной колбе вместимостью 1000 мл навеску натрия хлорида массой 9 г растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, доводят объем раствора до метки и тщательно перемешивают.

*Раствор реагента:* во флакон с лиофилизатом добавляют 0,9% раствор натрия хлорида объемом 4 мл, после полного растворения реагент готов для проведения анализа.

Для построения калибровочных графиков:

*Промежуточный раствор олова:* в мерную колбу вместимостью 50 мл точную навеску олова (II) хлорида дигидрата массой 0,4784 г (погрешность взвешивания не более $1 \cdot 10^{-4}$ г) растворяют в 0,1 М раствора HCl в токе инертного газа, доводят объем раствора до метки и тщательно перемешивают. Приготовленный промежуточный раствор содержит 5 мг/мл Sn (II).

***Приготовление растворов для количественного определения аскорбиновой кислоты.***

*Раствор лиофилизата*: во флакон с приготовленным лиофилизатом добавляют 0,9% раствор натрия хлорида объемом 4 мл, после полного растворения реагент готов для проведения анализа.

*Раствор квасцов железоаммонийных*: в мерной колбе вместимостью 100 мл навеску квасцов железоаммонийных массой 2,0 г растворяют на кипящей водяной бане в 30 мл раствора 0,1 М кислоты хлористоводородной, после полного охлаждения объем раствора доводят тем же раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают.

*0,1 % раствор о-фенантролина:* навеску о-фенантролина 1-водного массой 0,05 г растворяют в 50 мл спирта 96% и перемешивают.

*1,5% раствор ортофосфорной кислоты:* 0,113 мл кислоты ортофосфорной растворяют в 450 мл воды в мерной колбе вместимостью 500 мл. Величину pH полученного раствора устанавливают в диапазоне 3,5 – 4,0 с помощью 55% раствора калия едкого. Объем раствора в колбе доводят водой до метки и перемешивают.

*Стандартный раствор:* навеску аскорбиновой кислоты массой 0,5 г растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 1,5 % растворе ортофосфорной кислоты. Объем доводят тем же раствором до метки и перемешивают.

## 2.3 Методика проведения радиометрических измерений

При выполнении исследований диссертационной работы проводились радиометрические измерения активности гамма-излучающего радионуклида технеция-99м в пробах, отобранных из исследуемых растворов, с помощью радиометра «Дозкалибратор» РИС-А1. (рисунок 2.1).

Радиометры такого типа используются в лабораториях радиоизотопной диагностики, отделениях лучевой терапии, а также в ПЭТ-центрах и при приготовлении радиофармпрепаратов. Прибор предварительно был настроен на измерение активности технеция-99м.

Рисунок 2.1 – Радиометр «Дозкалибратор» РИС-А1 для сканирования анализируемых проб

Для проведения измерений флаконы с испытуемыми суспензиями и растворами помещали в камеру радиометра. Полученные показания прибора выдаются в [ГБк]. Для повышения точности измерения пробы измерялись по 3 раза с последующим нахождением среднего значения измеренной активности.

Для учета поправки на время распада использовали соотношение:

$$A(t) = A_{\text{ср}} \cdot e^{-\lambda \Delta t} \tag{2.1}$$

где $A_{\text{ср}}$ – средняя активность, $\lambda$=0,1151 ч$^{-1}$ – постоянная распада технеция-99м, $\Delta t$ – интервал времени, приведенный к одному общему времени.

## 2.4 Методика получения радиохроматограмм

Распределение радиоизотопа технеция-99м по всей длине хроматограммы изучается с помощью гамма-детектирующей установки «ГаммаСкан-01А» (рисунок 2.2).

Радиохроматограммы необходимы для расчета радиохимического выхода меченого препарата «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc» и таких его показателей качества, как радиохимическая чистота и процентное содержание радиохимической примеси, содержащейся в радиофармацевтическом препарате.

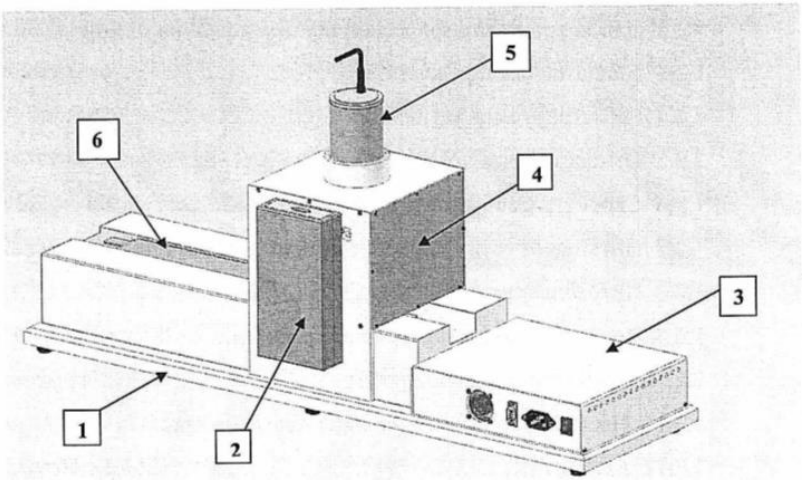



Рисунок 2.2 – Схема гамма-детектирующей установки «ГАММАСКАН-01А» для тонкослойной хроматографии

1 – основание; 2 – USB-контроллер блока детектирования; 3 – блок питания и управления шагового привода; 4 – несущий каркас со свинцовой защитой; 5 – блок детектирования со щелевым коллиматором; 6 – каретка для хроматографических полос.

Методика получения радиохроматограмм основана на методе тонкослойной хроматографии и заключается в следующем. Испытуемый образец с радиоизотопом $^{99m}$Тс в объеме 5 мкл наносят с помощью автоматической вари-пипетки на предварительно подготовленную алюминиевую пластину со слоем силикагеля (тип «Sorbfil», размер 20×150 мм), отступив от края на 20 мм – линия старта. Затем пластину с пятном высушивают досуха с помощью термостолика для ТСХ и помещают в подготовленную хроматографическую камеру. На дно камеры предварительно вносят хроматографическую смесь (подвижную фазу), высота раствора в камере должна составлять не более 1 см. Затем в хроматографическую камеру помещают пластины. Высота поднятия фронта растворителя по хроматограмме должна составлять около 10 см от линии старта.

После этого, хроматограммы вынимают из камер и высушивают досуха. Обертывают в прозрачную липкую ленту и проводят радиохроматографирование на гамма-детектирующей установке. Перед проведением измерений проводят ее калибровку.

По окончании сканирования на монитор компьютера выдается информация на каком расстоянии от края пластины достигаются максимумы гамма-излучения $^{99m}$Тс и о процентном соотношении площадей пиков активности к общей активности хроматограммы.

При хроматографировании в двух подвижных фазах можно сделать точную оценку содержания меченного комплекса в полученном РФП, а также радиохимических примесей.

Так при снятии хроматограммы в ацетоне величину примеси пертехнетат,$^{99m}$Тс-ионов А рассчитывают по формуле:

$$A = N_1/N_2 \cdot 100\ [\%], \qquad (2.2)$$

где $N_I$ - скорость счета на верхнем участке хроматограммы, содержащего ионы технеция-99м, имп/с; $N_2$ - скорость счета всей хроматограммы, имп/с.

Точно также, при хроматографировании в смеси [этанол : аммиак : $H_2O$] измеряют скорость счета от участка, содержащего гидролизованный технеций ($^{99m}TcO_2$), и от всей хроматограммы.

Здесь величину примеси В гидролизованного оксида ($^{99m}TcO_2$) рассчитывают по формуле:

$$B = N_1/N_2 \cdot 100\ [\%], \tag{2.3}$$

При этом общее содержание радиохимической примеси в радиофармпрепарате определяют по сумме:

$$\text{РХП} = (\text{А} + \text{В}). \tag{2.4}$$

Соответственно радиохимическую чистоту препарата находят из соотношения:

$$\text{РХЧ} = 100 - (\text{А} + \text{В}). \tag{2.5}$$

Результаты измерений радиохроматографирования препарата заносят в протокол.

## 2.5 Методика определения величины pH

Определение водородного показателя (pH) растворов необходимо для контроля кислотности раствора, разрабатываемого радиофармпрепарата, предназначенного для внутривенного введения.

Потенциометрическое определение величины pH заключается в измерении электродвижущей силы (ЭДС) электродной системы, в которой используется в качестве ионоселективного электрода – чувствительный к ионам водорода электрод, в свою очередь, электродом сравнения является стандартный электрод с

известной величиной потенциала (обычно хлорсеребряный электрод). Для измерения величины pH в большинстве случаев применяется метод градуировочного графика. Величина pH испытуемого раствора зависима с pH стандартного раствора по следующему уравнению:

$$pH = pH_S - \frac{E - E_S}{k} \tag{2.6}$$

где $E$ – потенциал электрода испытуемого раствора; $E_S$ – потенциал электрода в стандартном растворе.

Для потенциометрического определения величины pH используют иономеры или pH-метры, их чувствительность должна быть не менее 0,005 единиц pH или 3 мВ. Калибровка таких приборов проводится по стандартным буферным растворам. Вид используемого в работе pH-метра S220 SevenCompact представлен на рисунке 2.3.

Рисунок 2.3 – pH-метр/иономер S220 SevenCompact

Измерение величины pH исследуемых растворов радиофармпрепаратов и продуктов их синтеза проводятся в соответствии с «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности» (ОСПОРБ – 99/2010).

## 2.6 Методы статистической обработки результатов

Для достоверности экспериментальных исследований необходимо все результаты радиометрических измерений подвергнуть статистической обработке. Данную обработку таких измерений необходимо проводить с применением критерия Стьюдента в доверительном интервале ± 1% и при доверительной вероятности 95% от среднего значения. При этом радиометрические измерения должны проводиться не менее 5 повторений, каждое при этом должно включать в себя последовательные внесенные поправки на время распада радионуклида [104, 105].

Полученные при проведении исследований экспериментальные данные подвергаются обработке с помощью набора программ Microsoft office и методом «наименьших квадратов». При этом строится следующая зависимость:

$$y = f(x, a_0, a_1, \dots, a_k). \tag{2.7}$$

Сумма квадратов отклонений измеренных значений $y_i$ от расчетных $f(x_i, a_0, a_1, \dots, a_k)$ должна быть наименьшей в этом случае (рисунок 2.4)

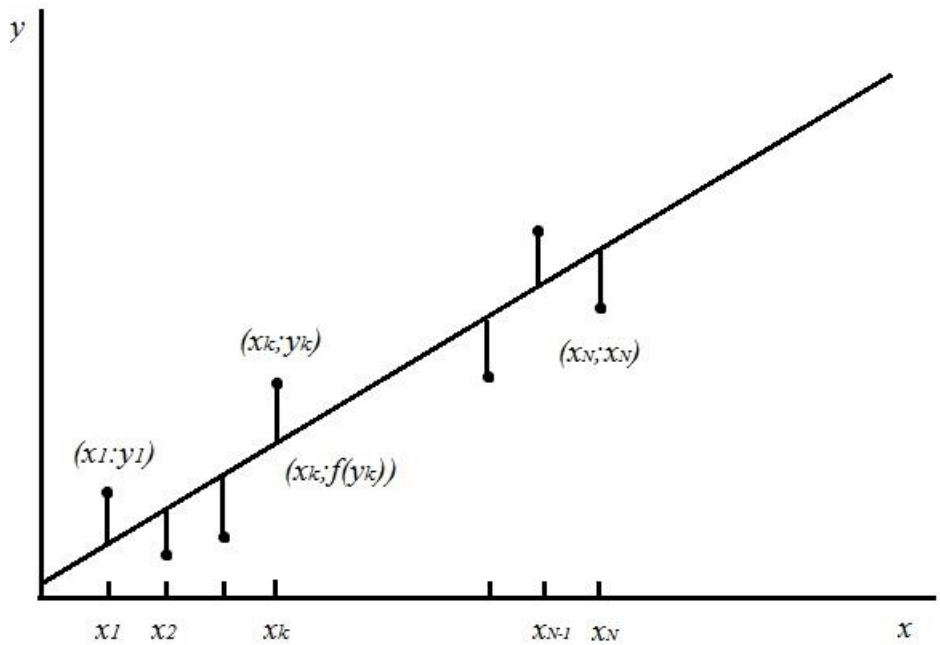



Рисунок 2.4 – График зависимости y = f(x)

Математически эта задача сводится к определению параметров $a_0$, $a_1$, $a_2$, ...,$a_k$, при которых функция принимает минимальное значение.

Построение линейной зависимости данной функции (линии регрессии) требует определения параметров функции $y = ax + b$. С этой целью составляется уравнение для функции $S$:

$$S = \sum_{i=1}^{n}[y_i - ax_i - b]^2. \tag{2.8}$$

Система линейных уравнений для их последующего решения, формируется путем дифференциации функции $S$ по $a$ и $b$.

С помощью коэффициента корреляции оценивается линейная связь между x и y. Коэффициент корреляции рассчитывается по следующей формуле:

$$r = \frac{\frac{1}{n}\sum x_i \cdot y_i - \bar{x} \cdot \bar{y}}{\sigma_x \cdot \sigma_y} \tag{2.9}$$

Небольшое отличие абсолютной величины $r$ от единицы, обеспечивает более близкое расположение экспериментальных точек к линии регрессии. Если коэффициент корреляции приравнивается к нулю, то переменные $x$ и $y$ являются некоррелированными.

Для проверки коэффициента корреляции обычно используется критерий Стьюдента. Формула для вычисления данного критерия представлена ниже:

$$t = \frac{\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \tag{2.10}$$

Сравнение значений проводится с помощью таблицы распределения Стьюдента при доверительной вероятности 0,95 и соответствующем числе степеней свободы. Коэффициент корреляции значительно отличен от нуля если вычисленное значение $t$ оказывается больше табличного значения.

## 2.7 Выводы по главе

1. Приведен перечень и характеристика веществ, материалов и основного оборудования, использованного при проведении исследований по получению радиофармацевтических препаратов на основе 5-тио-D-глюкозы, меченной технецием-99м.

2. Представлены методики по приготовлению исходных компонентов и растворов для приготовления разрабатываемого радиофармацевтического препарата.

3. Описана методика проведения радиометрических измерений активности гамма-излучающих радионуклидов в пробах, отобранных из исследуемых растворов будущего радиофармпрепарата.

4. Рассмотрена методика получения радиохроматограмм, с дальнейшим определением радиохимической чистоты препарата и процентным содержанием радиохимических примесей, которые могут быть в приготовленном радиофармпрепарате.

5. Приведена методика определения водородного показателя (pH) растворов, которая необходима для контроля кислотности раствора, разрабатываемого радиофармпрепарата, предназначенного для внутривенного введения.

6. Представлена методика статистической обработки экспериментальных результатов радиометрических измерений активностей $^{99m}$Tc в пробах с использованием критерия Стьюдента.

# Глава 3 Разработка технологии получения радиофармпрепарата и лиофилизированного набора реагента на основе 5-тио-D-глюкозы

## 3.1 Выбор основного компонента

Соединение 5-тио-D-глюкоза является функциональным аналогом глюкозы [106], которая принимает участие в обмене веществ живых клеток организма [107]. Исходя из того, что это соединение активно участвует в процессах обмена (в метаболизме), оно может служить транспортирующим агентом, для доставки радиоактивной метки в опухоль. Есть сведения, что 5-тио-D-глюкоза способствует устранению гипоксической защиты онкологических клеток, что создает дополнительную возможность для поступления меченого лекарственного средства в опухоль, как с целью диагностики, так и с целью терапии новообразований [108, 109]. Поэтому 5-тио-D-глюкоза имеет все предпосылки для введения в нее радиоактивной метки технеция-99м и использования в качестве индикатора для обеспечения визуализации онкологических процессов.

На сегодняшний день известно достаточно много работ [14, 96, 97, 110, 111 и др.], в которых предпринимаются попытки изготовления диагностических радиофармпрепаратов на основе 5-тио-D-глюкозы различного состава. В основном в них описываются методики приготовления препарата путем смешивания тех или иных реагентов непосредственно перед введением препарата в организм. Все это создает ряд неудобств с точки зрения проведения контроля качества приготовляемого РФП и трудно реализуемо в условиях медицинских лабораторий.

С учетом сказанного, основной задачей исследований является разработка технологии приготовления реагента на основе 5-тио-D-глюкозы в лиофилизированной форме с увеличенным за счет этого сроком годности и возможностью его поставки в клиники для последующего получения в них РФП путем смешивания реагента с элюатом технеция-99м, выделенным из генератора по месту приготовления препарата.

В настоящее время известен относительно простой способ получения 5-тио-D-глюкозы с технецием-99м [97], в соответствии с которым препарат $^{99m}$Tc-5-тио-D-глюкозу готовят путем смешивания 10 мг 5-тио-D-глюкозы и 1 мл физраствора с 0,01-2,00 мг хлорида олова (II) дигидрата с последующим введением в полученную смесь 2-4 мл раствора натрия пертехнетата,$^{99m}$Tc с активностью 3,7 ГБк. При этом эффективность мечения составляет 98,5 ± 0,8 %. Вместе с тем, авторы не рассматривают возможность приготовления лиофилизата, поэтому исходная смесь реагентов для получения препарата не может храниться более 1-2 часов, вследствие окисления олова (II) до 4-х валентного состояния.

Примерно такая же технология приготовления меченной $^{99m}$Tc 5-тио-D-глюкозы описана в другой публикации [96]. Здесь во флакон, содержащий смесь 5-тио-D-глюкозы (5 мг) и $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,080 мг), добавляют элюат $^{99m}TcO^{4-}$ из расчета 20 мКи/мл. После перемешивают в течение 10 мин.

Как показала экспериментальная проверка, при приготовлении лиофилизатов из приведенных выше составов реагентов, выход меченого целевого продукта в фильтратах 200 нм не превышал 40 процента. Большая часть активности $^{99m}$Tc при этом адсорбировалась на образующемся в препаратах коллоиде, возможно $(\text{-O-TcO-O-}SnCl_2\text{-O-TcO-})_n$. При этом на хроматограммах полученных РФП в среде ацетона «АЦ» (рисунок 3.1) обнаруживалось помимо пика $^{99m}$Tc(VII) (55 мм) еще два пика: исходной субстанции 5-тио-D-глюкозы (далее 5-ТДГ) и, возможно, гидролизованного оксида $^{99m}TcO_2$.

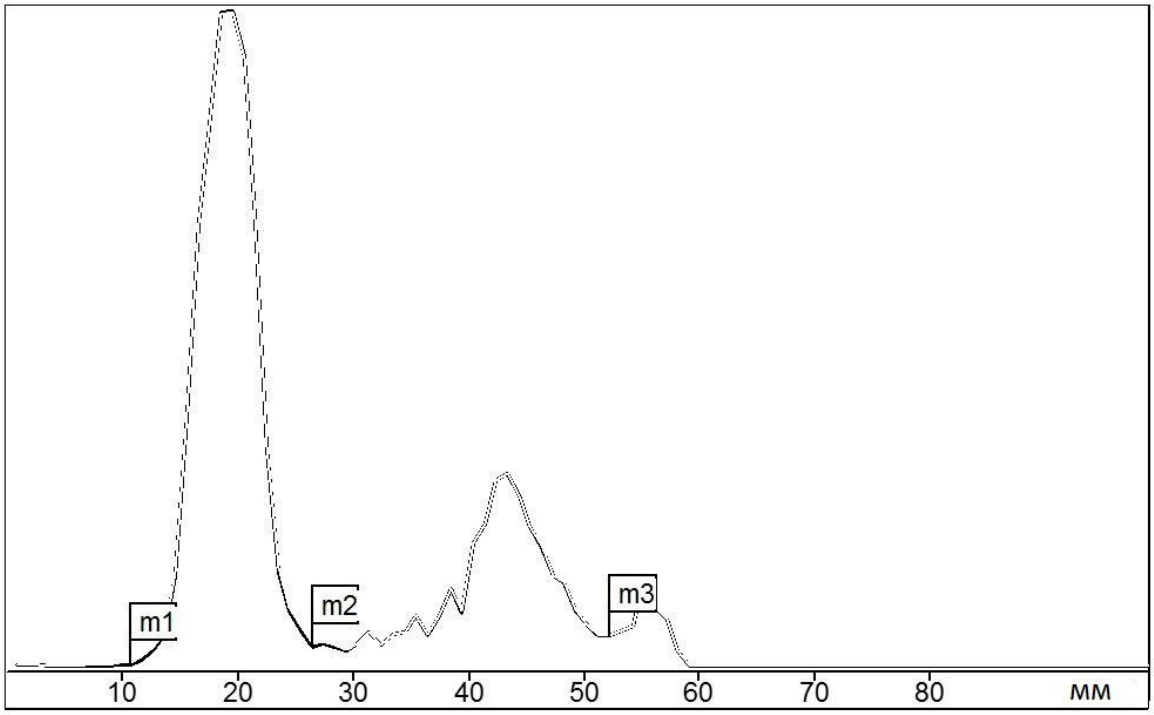



Рисунок 3.1 – Хроматограмма препарата, полученного по методике, описанной в работах [96, 97].

Состав смеси [5 мг 5-ТДГ + 0,08 мг Sn(II)] + элюат $^{99m}$Tc, через 30 мин после приготовления. Подвижная фаза «АЦ»

О появлении второго пика субстанции свидетельствует и фотография хроматограммы после ее обработки смесью ($KMnO_4$+$H_2SO_4$+$CH_3COOH$), представленная на рисунке 3.2.

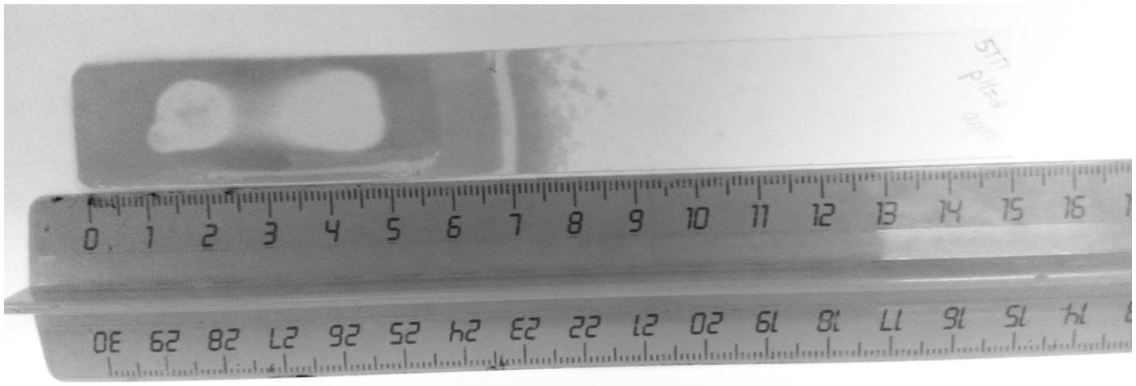


Рисунок 3.2 – Фото хроматограммы препарата $^{99m}$Tc-5-тио-D-глюкозы, полученного по методике, описанной в работах [96, 97] в среде «АЦ», обработанной в смеси ($KMnO_4$+$H_2SO_4$+$CH_3COOH$)

Так как наблюдается частичное разложение получаемого комплекса, то такой препарат нельзя считать чистым, безопасным и возможно эффективным.

Поэтому основной задачей настоящего исследования является разработка технологии получения стабильного набора реагентов для приготовления РФП на основе 5-тио-D-глюкозы меченной технецием-99м, который имел бы уровень радиохимической чистоты не менее 95%.

## 3.2 Исследование растворимости субстанции 5-тио-D-глюкоза

Прежде чем проводить экспериментальные исследования по разработке нового радиофармпрепарата, необходимо было исследовать растворимость его основного компонента – 5-тио-D-глюкозы. В соответствии с выбранной программой была проведена проверка растворимости субстанции в следующих средах: 0,9 % раствор NaCl (физиологический раствор), 5 % раствор $NaHCO_3$, солянокислая среда, щелочной раствор, обезвоженный $C_2H_5OH$ и другие. Температурный режим – от 15 до 25°С. Также была проверена растворимость субстанции в хроматографической смеси следующего состава: $C_2H_5OH$ : $NH_4OH$ : $H_2O$ с объемным соотношением компонентов в смеси 2 : 5 : 5, с целью проведения последующей радиохроматографии полученного радиофармпрепарата.

***Исследование растворимости 5-тио-D-глюкозы.***

1. Проверка растворимости в обезвоженном спирте. Во флакон объемом 10 мл, содержащий 100 мг 5-тио-D-глюкозы (5-TDГ), ввели 1 мл обезвоженного спирта $C_2H_5OH$. После тщательного перемешивания наблюдалось слабое растворение. Значение pH смеси составляло 6,5. Такой же результат был получен при снижении количества 5-TDГ до 10 мг.

2. Проверка растворимости в 5 % растворе гидрокарбоната $NaHCO_3$. Во флакон с 100 мг 5-TDГ ввели 1 мл 5 % раствора $NaHCO_3$. После перемешивания наблюдалось достаточно хорошее растворение. Значение pH смеси составляло 7.

3. Проверка растворимости в 0,5 М растворе NaOH. Во флакон с 100 мг 5-TDГ ввели 1 мл 0,5 М раствора NaOH. После перемешивания наблюдалось активное растворение. Значение pH смеси было равно 12. Спустя 30 минут после начала эксперимента в растворе образовалась взвесь белого цвета, что возможно связано с нарушением исходной структуры 5-тио-D-глюкозы.

4. Проверка растворимости в 0,5 М растворе HCl. Во флакон с 100 мг 5-TDГ ввели 1 мл 0,5 М HCl. После перемешивания наблюдалось активное растворение. Значение pH полученной смеси составляло 1,5.

5. Проверка растворимости в 0,9 % растворе NaCl. Во флакон с 100 мг 5-TDГ ввели 1 мл физиологического раствора. После перемешивания наблюдалось быстрое растворение. Значение pH раствора 5.

6. Проверка растворимости в $H_2O$. Во флакон с 100 мг 5-TDГ ввели 1 мл дистиллированной воды. После перемешивания наблюдалось быстрое растворение. Значение pH полученного раствора 5.

7. Проверка растворимости в смеси $C_2H_5OH$ : $NH_4OH$ : $H_2O$ ÷ 2 : 5 : 5. Во флакон с 100 мг 5-TDГ ввели 1 мл подготовленной смеси. После перемешивания наблюдалось быстрое растворение 5-TDГ. Значение pH полученной смеси 5.

Полученные результаты исследования растворимости 5-TDГ приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Проверка растворимости 5-тио-D-глюкозы

| № | Растворитель | Степень растворимости | pH полученной смеси |
|---|---|---|---|
| 1 | Обезвоженный $C_2H_5OH$ | Слаборастворим | 6,5 |
| 2 | 5 % раствор $NaHCO_3$ | Растворим | 7 |
| 3 | 0,5 М раствор NaOH | Растворим | 12 |
| 4 | 0,5 М раствор HCl | Растворим | 1,5 |
| 5 | 0,9 % раствор NaCl | Растворим | 5 |
| 6 | $H_2O$ | Растворим | 5 |
| 7 | $C_2H_5OH$ : $NH_4OH$ : $H_2O$ | Растворим | 5 |

По результатам проведенных исследований был сделан вывод, что полное растворение 5-тио-D-глюкозы без образования коллоида наблюдается в воде, физиологическом растворе, 5 % растворе $NaHCO_3$ и солянокислом растворе, что предоставляет широкие возможности для проведения в этих средах исследований по введению радиоактивной метки $^{99m}Tc$ в структуру 5-TDГ. В хроматографической смеси $C_2H_5OH$ : $NH_4OH$ : $H_2O$ ÷ 2 : 5 : 5 субстанция также хорошо растворима, что позволяет ее использовать в качестве подвижной фазы для проведения хроматографического изучения продуктов мечения 5-тио-D-глюкозы методом ТСХ.

### 3.3 Выбор восстанавливающего агента для натрия пертехнетата,$^{99m}$Tc

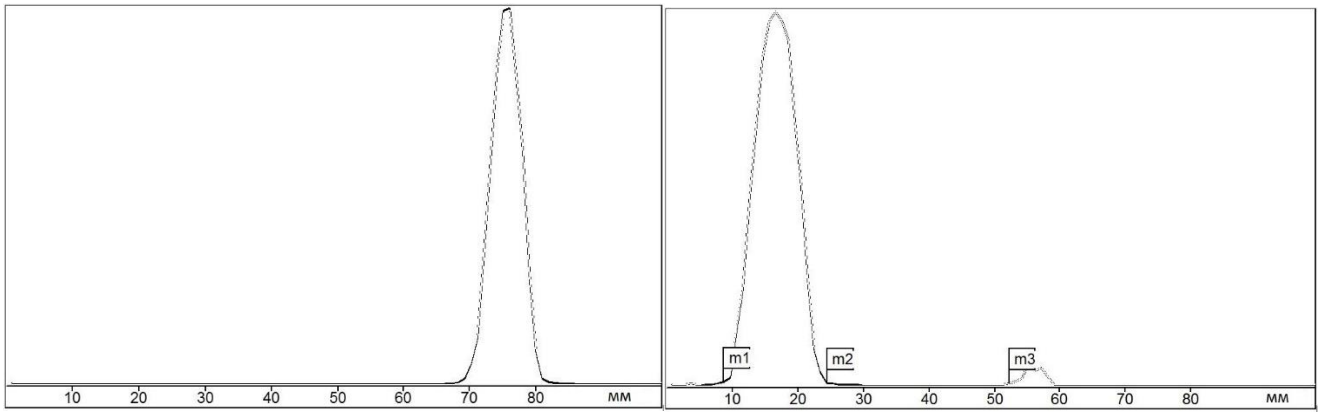
Как уже было отмечено, семивалентный $^{99m}Tc$, присутствующий в элюате, выделяемом из генератора технеция-99м, в виде раствора натрия пертехнетата ($Na^{99m}TcO_4$), напрямую не используется для приготовления РФП, поскольку не обладает комплексообразующими свойствами. Напротив, в восстановленной форме технеций достаточно легко взаимодействует с хелатообразующими реагентами. На процесс восстановления пертехнетата влияет природа окислителей, величина pH среды, продукты радиолиза воды и прочее. Различают три способа восстановления $^{99m}Tc$ для получения РФП:

- восстановление пертехнетата,$^{99m}Tc$ в присутствии лиганда, когда валентное состояние технеция определяется в основном природой лиганда;
- создание условий, когда лиганд одновременно выполняет функции восстановителя и комплексообразующего агента;
- разделение стадий восстановления и комплексообразования во времени, при этом пертехнетат в присутствии лиганда сначала превращается в устойчивое, но легко вступающее в реакцию соединения, а на второй стадии происходит его взаимодействие с этим лигандом.

Для восстановления пертехнетата $^{99m}Tc$ предлагается ряд различных восстановителей: ионы олова Sn(II), аскорбиновая кислота в сочетании с Fe**(**II**),** боргидрид натрия, тиосульфат натрия, гидразин, сульфгидрильные и альдегидные соединения. Наиболее часто для восстановления пертехнетата используется двухвалентное олово Sn(II) в виде дихлорида дигидрата $SnCl_2 \cdot 2H_2O$. В данном случае реакция восстановления $^{99m}Tc$ в присутствии Sn(II) схематически может быть представлена следующим уравнением:

$$2\ ^{99m}TcO_4^- + 16\ H^+ + 3\ Sn^{2+} \leftrightarrow 2\ ^{99m}Tc^{4+} + 3\ Sn^{4+} + 8\ H_2O$$

В данных исследованиях для перевода $^{99m}Tc(VII)$ в $^{99m}Tc(IV)$ в качестве восстанавливающего агента также был выбран дихлорид олова дигидрат, с которым и были проведены все последующие эксперименты. О закономерностях взаимодействия ионов Sn (II) с $^{99m}Tc$ можно судить по следующим полученным хроматограммам (рисунок 3.3).




А Б

Рисунок 3.3 – Хроматограммы исходного элюата технеция-99м (А) и смеси [элюат $^{99m}Tc$ + Sn (II)] (Б)

На рис. 3.3 приведены хроматограммы исходного элюата технеция-99м и раствора, полученного после введения в элюат раствора олова дихлорида

дигидрата в количестве 0,044 мг/мл. В качестве подвижной фазы (ПФ) использовался ацетон («АЦ»).

Хроматографирование проводилось на пластинах с тонким слоем силикагеля типа "Sorbfil" размером 20×150 мм с последующим изучением распределения активности технеция-99м по длине хроматограммы с помощью установки «ГаммаСкан-01А» согласно методике, описанной в разделе 2.5.

Из представленных хроматограмм (рисунок 3.3) следует, что пик активности исходного 7-валентного $^{99m}$Tc перемещается вместе с фронтом растворителя, тогда как, при введении в элюат ионов Sn(II), основной пик остается на линии старта в области $R_f$ = 0,1. Это позволяет предположить, что в результате добавления восстановителя происходит образование малоподвижного гидролизованного оксида $^{99m}TcO_2$.

Возможно также дополнительное образование комплекса восстановленного $^{99m}$Tc с оловом в результате хемосорбция радионуклида на поверхности коллоида олова типа $(\text{-O-TcO-O-SnCl}_2\text{-O-TcO-})_n$, где $n$ = 2, 3…– число, зависящее от pH раствора [112] или же коллоида, образующегося при гидролизе избытка $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ по реакции:

$$SnCl_2 + H_2O \rightarrow Sn(OH)Cl + HCl.$$

Вероятность такого взаимодействия технеция-99м с коллоидом достаточно велика из-за несоизмеримого малого количества ядер $^{99m}$Tc по сравнению с количеством атомов олова. Точная информация об этом в литературных источниках отсутствует. Вместе с тем, наличие пика на линии старта в области $R_f$ = 0,1, скорее всего свидетельствует о процессе восстановления $^{99m}$Tc и образовании гидролизованного оксида.

Исходя из сказанного, на первой стадии исследований нужно было определить необходимое и достаточное количество ионов Sn (II), требуемое для полного восстановления $^{99m}$Tc в составе реакционной смеси, поскольку введение в

РФП более высокого количества Sn (II) по указанным выше причинам может быть нецелесообразным.

Для приготовления исходного раствора Sn (II) была использована методика, описанная в разделе 2.2. Концентрация ионов Sn (II) в полученном растворе составляла 3,68 мг/мл. После этого, пробы раствора объемом 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 и 40 мкл были введены во флаконы с элюатом $^{99m}$Tc (РФП). Объемы препарата V(РФП) и значения концентраций введенного олова C(Sn (II)) приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Значения концентраций Sn (II) в растворах элюата $^{99m}$Tc

| № флакона | V(РФП), мл | V(Sn (II)), мкл | m (Sn (II)), мг/фл | C(Sn (II)), мг/мл |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 5 | 0,0184 | 0,0046 |
| 2 | | 10 | 0,0368 | 0,0092 |
| 3 | | 15 | 0,0552 | 0,0138 |
| 4 | | 20 | 0,0737 | 0,0184 |
| 5 | | 25 | 0,0921 | 0,0230 |
| 6 | | 30 | 0,1105 | 0,0276 |
| 7 | | 35 | 0,1289 | 0,0322 |
| 8 | | 40 | 0,1473 | 0,0368 |

После введения ионов Sn (II), из каждого флакона были отобраны пробы объемом 5 мкл и нанесены на пластинки для хроматографирования. Процесс хроматографирования проводили в среде ацетона в течение 10 мин. Распределение $^{99m}$Tc по длине хроматограмм изучали с помощью установки «ГаммаСкан-01А». Содержание в приготовленных смесях восстановленного $^{99m}$Tc – Tc(восст.) и непрореагировавшего Tc(VII) оценивали из соотношения площадей соответствующих пиков на хроматограммах. Результаты хроматографирования приведены в таблице 3.3 и на рисунке 3.4.

Таблица 3.3 – Результаты хроматографирования смесей: элюат $^{99m}$Tc–Sn (II)

| № флакона | C(Sn(II)), мг/мл | Tc(VII),% | Tc(восст.),% |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,0046 | 12,5 | 87,5 |
| 2 | 0,0092 | 7,2 | 92,8 |
| 3 | 0,0138 | 3,9 | 96,1 |
| 4 | 0,0184 | 2,8 | 97,2 |
| 5 | 0,0230 | 2,1 | 97,9 |
| 6 | 0,0276 | 1,8 | 98,2 |
| 7 | 0,0322 | 1,1 | 98,9 |
| 8 | 0,0368 | 0,7 | 99,3 |

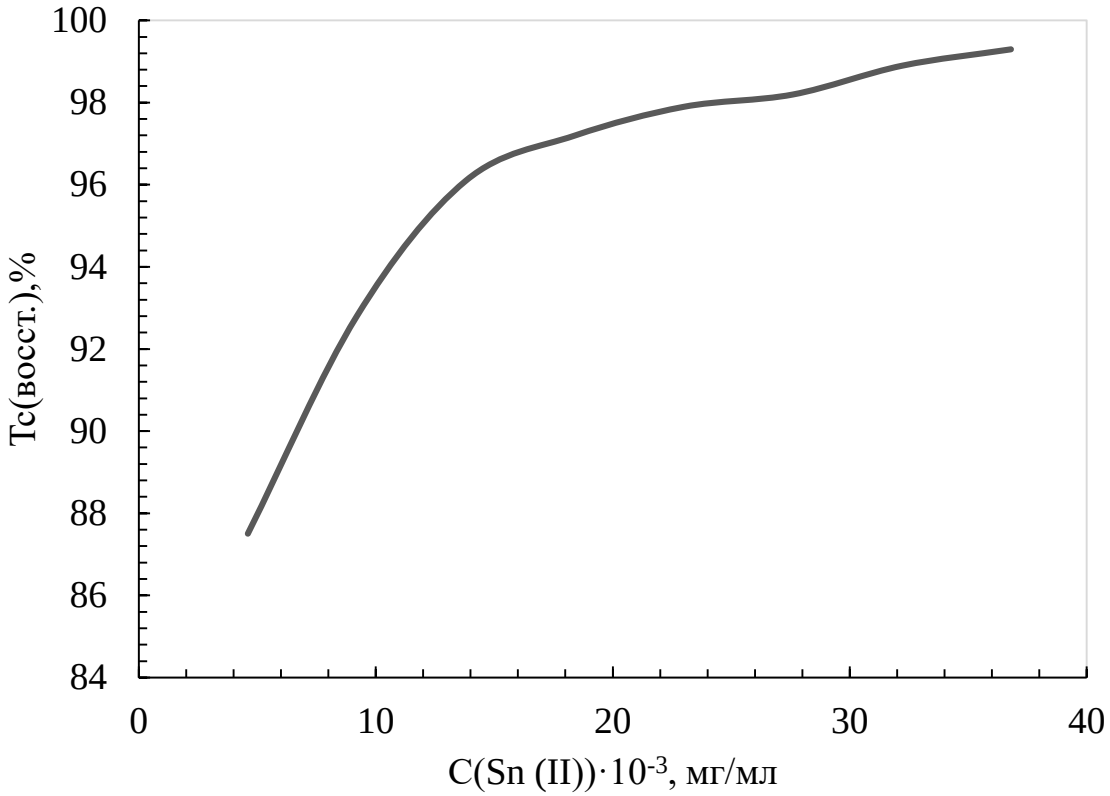



Рисунок 3.4 – Изменение содержания восстановленного $^{99m}$Tc в зависимости от концентрации ионов Sn (II) в растворе

Из представленных данных видно, что содержание восстановленного $^{99m}$Tc в препарате возрастает по мере увеличения концентрации в смеси ионов Sn (II).

При этом требуемая радиохимическая чистота РФП не менее 95 % достигается в том случае, если количество ионов Sn (II) в препарате составляет не менее 0,0138 мг/мл, что соответствует 15 мкл добавленного раствора олова.

## 3.4 Выбор систем подвижных фаз для хроматографических исследований 5-тио-D-глюкозы для мечения технецием-99м

Как показали приведенные выше экспериментальные исследования по изучению растворимости 5-тио-D-глюкозы, эта субстанция в ацетоне («АЦ») не растворяется. Подтверждением этому служит хроматограмма, приведенная на рисунке 3.5. Здесь пятно 5-TDГ, проявленное путем обработки пластин раствором перманганата калия с добавлением концентрированной серной кислоты, располагается на линии старта. Отсюда следует важный вывод, что 5-TDГ не препятствует определению в реакционной смеси примеси непрореагировавшего $^{99m}$Tc(VII), пик которого в среде ацетона перемещается по хроматограмме вместе с фронтом растворителя.

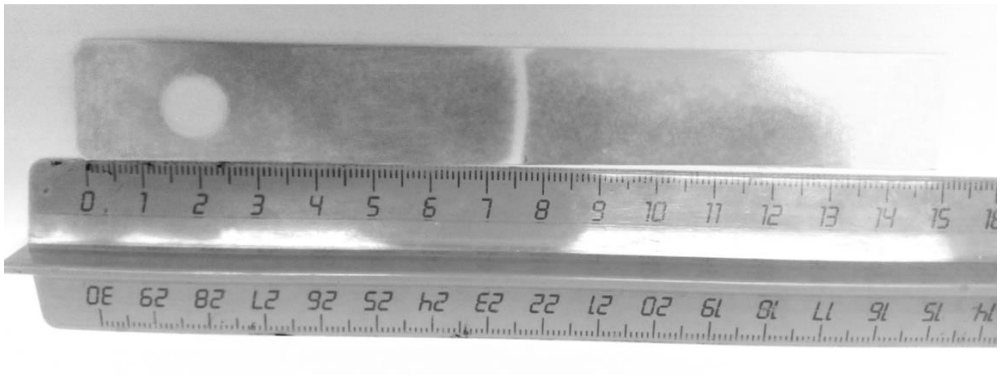


Рисунок 3.5 – Фото хроматограммы 5-тио-D-глюкозы в «АЦ»

Для получения хроматограммы на рисунке 3.5 навеску 5-TDГ массой 15 мг растворили в 1 мл дистиллированной воды. Затем довели величину pH раствором 1 М соляной кислоты до 4,5. Пробу полученного раствора объемом 5 мкл нанесли на пластину "Sorbfil". После хроматографирования в среде ацетона в течение 15

мин полоску обработали раствором перманганата калия с добавлением концентрированной серной кислоты. Хроматограмма на рисунке 3.5 показывает, что субстанция 5-тио-D-глюкоза остается на линии и не перемещается вместе с фронтом растворителя.

В дальнейшем, для изучения поведения 5-тио-D-глюкозы и получения хроматограмм продуктов ее взаимодействия с технецием-99м была подобрана подвижная фаза следующего состава [этанол : аммиак : вода ÷ 2 : 5 : 5] – далее по тексту «ЭТ».

На рисунке 3.6 показана хроматограмма того же раствора, который был исследован выше в среде ацетона, но полученная в подвижной фазе «ЭТ» с последующей индикацией распределения вещества по длине пластины с помощью раствора перманганата калия с добавлением концентрированной серной кислоты.

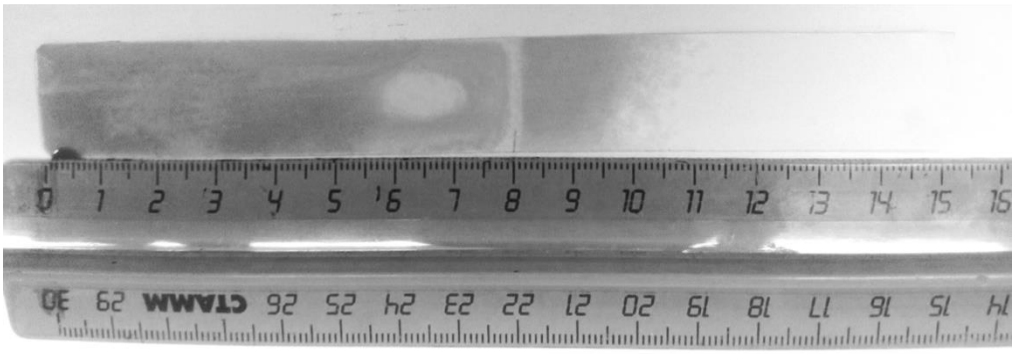


Рисунок 3.6 – Фото хроматограммы 5-тио-D-глюкозы в смеси «ЭТ»

Из представленной хроматограммы следует, что субстанция 5-тио-D-глюкоза перемещается в среде «ЭТ» вместе с фронтом растворителя. Отдельно следует отметить, что в этой подвижной фазе вместе с фронтом перемещается также и невосстановленный $^{99m}Tc(VII)$, в то время как восстановленные продукты $^{99m}Tc(IV)$ и его оксид $^{99m}TcO_2$ остаются на линии старта.

Следует отметить, что использование методики хроматографирования (описанной в разделе 2.5) продуктов синтеза в двух подвижных фазах «АЦ» и

«ЭТ» позволяет сделать точную оценку содержания в полученном РФП меченного целевого продукта – «5-тио-D-глюкозы, $^{99m}$Tc», а также радиохимических примесей непрореагировавшего $^{99m}$Tc(VII) и гидролизованного оксида $^{99m}TcO_2$.

### 3.5 Разработка состава реагентов для получения препарата «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc»

Основным требованием к радиофармпрепаратам является устойчивость химической связи исходной субстанции с радиоактивным маркером. Достаточно часто это достигается путем введения в состав реакционной смеси различных вспомогательных веществ, например, добавок, стабилизирующих валентное состояние реагирующих веществ.

Для выявления необходимых и достаточных количеств в составе смеси основной субстанции и восстанавливающего агента Sn(II), предварительно была проведена серия экспериментов. В отличие от известных работ [96, 97], где для приготовления радиофармпрепарата использовались навески 5-тио-D-глюкозы массой от 5 до 10 мг, нами был исследован более широкий диапазон концентраций. Параллельно проводилось определение предельно допустимого содержания в составе реакционной смеси двухвалентного олова дихлорида дигидрата, при котором примесь невосстановленного $^{99m}$Tc(VII) не превышала 5 % от исходной его активности. Здесь для приготовления раствора ионов Sn (II) использовали методику, описанную в разделе 2.2.

Программа проведения экспериментов состояла в следующем: навески 5-тио-D-глюкозы с массой от 5 до 20 мг растворяли в 1 мл воды для инъекций и после к ним добавляли различные объемы раствора с ионами Sn (II). Смеси тщательно перемешивали, затем вводили элюат $^{99m}$Tc в объеме 4 мл. После перемешивания полученный препарат инкубировали в течение 30 мин с последующим отбором проб по 5 мкл для снятия хроматограмм. Массы навесок 5-

тио-D-глюкозы, объемы и количества добавленного $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, а также результаты определения выхода меченого продукта и его радиохимической чистоты представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Результаты определения выхода меченной $^{99m}Tc$ 5-тио-D-глюкозы в зависимости от количества $SnCl_2 \cdot 2H_2O$

| m (5-TDГ), мг | V ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$), мкл | m ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$), мг | Выход меченного продукта, % | РХЧ, % |
|---|---|---|---|---|
| 5 | 15 | 0,105 | 25,84 | 53,5 |
| | 20 | 0,140 | 27,97 | 61,1 |
| | 25 | 0,175 | 32,51 | 71,0 |
| | 30 | 0,210 | 31,77 | 73,5 |
| | 35 | 0,245 | 34,52 | 72,9 |
| | 40 | 0,280 | 27,69 | 62,5 |
| 10 | 15 | 0,105 | 37,77 | 64,0 |
| | 20 | 0,140 | 37,90 | 62,3 |
| | 25 | 0,175 | 42,25 | 73,2 |
| | 30 | 0,210 | 44,74 | 71,5 |
| | 35 | 0,245 | 41,00 | 72,8 |
| | 40 | 0,280 | 33,69 | 69,1 |
| 15 | 15 | 0,105 | 42,80 | 65,9 |
| | 20 | 0,140 | 51,78 | 76,1 |
| | 25 | 0,175 | 53,52 | 76,0 |
| | 30 | 0,210 | 48,76 | 74,8 |
| | 35 | 0,245 | 40,81 | 70,1 |
| | 40 | 0,280 | 36,25 | 58,4 |
| 20 | 15 | 0,105 | 24,73 | 52,4 |
| | 20 | 0,140 | 26,86 | 60,0 |
| | 25 | 0,175 | 31,40 | 69,9 |
| | 30 | 0,210 | 30,87 | 72,4 |
| | 35 | 0,245 | 33,41 | 71,8 |
| | 40 | 0,280 | 26,58 | 61,4 |

Из представленных в таблице результатов следует, что лучшие показатели выхода меченного продукта и его РХЧ достигаются для смеси, содержащей 15 мг

производной 5-TDГ и 0,175 мг восстанавливающего агента $SnCl_2 \cdot 2H_2O$. Однако величина радиохимической чистоты полученного здесь продукта является недостаточной. С целью ее повышения в состав исходной смеси было введено небольшое количество 0,05М раствора HCl до значения pH раствора 4,0, замедляющего окисление восстанавливающего агента Sn(II). Кроме того, в состав смеси в качестве антиоксиданта была введена аскорбиновая кислота (АК), которая склонна к параллельному комплексообразованию с $^{99m}$Tc. Так же, как и в предыдущем случае, была проведена серия экспериментов по выявлению необходимого и достаточного количества добавленной АК (таблица 3.5) при установленном оптимальном количестве 5-тио-D-глюкозы 15 мг.

Таблица 3.5 – Результаты экспериментального получения меченной $^{99m}$Tc 5-TDГ в присутствии аскорбиновой кислоты

| m (Sn(II)), мг | V (АК), мкл | m (АК), мг | Выход меченного продукта, % | РХЧ, % |
|---|---|---|---|---|
| 0,105 (15 мкл) | 30 | 0,3 | 62,10 | 73,5 |
| | 40 | 0,4 | 67,86 | 80,3 |
| | 50 | 0,5 | 65,13 | 84,0 |
| | 60 | 0,6 | 66,55 | 79,1 |
| | 70 | 0,7 | 59,41 | 75,2 |
| | 80 | 0,8 | 59,63 | 74,9 |
| 0,140 (20 мкл) | 30 | 0,3 | 63,25 | 81,6 |
| | 40 | 0,4 | 66,00 | 83,7 |
| | 50 | 0,5 | 65,42 | 87,3 |
| | 60 | 0,6 | 73,46 | 88,1 |
| | 70 | 0,7 | 61,30 | 86,9 |
| | 80 | 0,8 | 62,44 | 86,0 |
| 0,175 (25 мкл) | 30 | 0,3 | 81,55 | 91,4 |
| | 40 | 0,4 | 85,47 | 96,5 |
| | 50 | 0,5 | 91,07 | 98,6 |
| | 60 | 0,6 | 88,32 | 97,1 |
| | 70 | 0,7 | 87,31 | 96,3 |
| | 80 | 0,8 | 87,49 | 95,9 |

*Продолжение таблицы 3.5*

| m (Sn(II)), мг | V (АК), мкл | m (АК), мг | Выход меченного продукта, % | РХЧ, % |
|---|---|---|---|---|
| 0,210 (30 мкл) | 30 | 0,3 | 70,91 | 85,3 |
| | 40 | 0,4 | 71,99 | 86,4 |
| | 50 | 0,5 | 71,62 | 90,3 |
| | 60 | 0,6 | 78,66 | 88,1 |
| | 70 | 0,7 | 85,21 | 88,0 |
| | 80 | 0,8 | 81,39 | 83,3 |
| 0,245 (35 мкл) | 30 | 0,3 | 72,65 | 81,7 |
| | 40 | 0,4 | 73,10 | 83,4 |
| | 50 | 0,5 | 84,99 | 85,1 |
| | 60 | 0,6 | 83,14 | 84,9 |
| | 70 | 0,7 | 85,77 | 82,4 |
| | 80 | 0,8 | 84,35 | 82,6 |

Как следует из данных таблицы 3.5, лучшие результаты величины выхода целевого продукта и его РХЧ достигаются при добавлении элюата $^{99m}$Tc к реакционной смеси, содержащей 25 мкл $SnCl_2$ и 50 мкл аскорбиновой кислоты и имеющей следующий оптимальный состав: [15 мг 5-тио-D-глюкозы + 0,175 мг $SnCl_2$ + 0,5 мг АК + 200 мкл 0,05М HCl]. Полученный в результате препарат имеет величину выхода меченого продукта 91,07 % при его радиохимической чистоте - 98,6 %.

Полученные показатели вполне соответствуют общепринятым нормативным требованиям для радиофармпрепаратов. Однако последующая проверка стабильности РФП показала, что уже через 90 мин после приготовления величина его РХЧ снизилась до 81 %, а через 120 мин – до уровня 68 %. Соответственно возросло содержание в препарате радиоактивной примеси $^{99m}$Tc(VII): через 90 мин почти до 19 %, а через 120 мин суммарной примеси $^{99m}$Tc(VII) и его восстановленных форм – более 31 %.

Об этом свидетельствуют и сравнительные хроматограммы РФП с ранее достигнутым оптимальным составом, сделанные после 90 и 120 минут приготовления (рисунки 3.7 и 3.8).

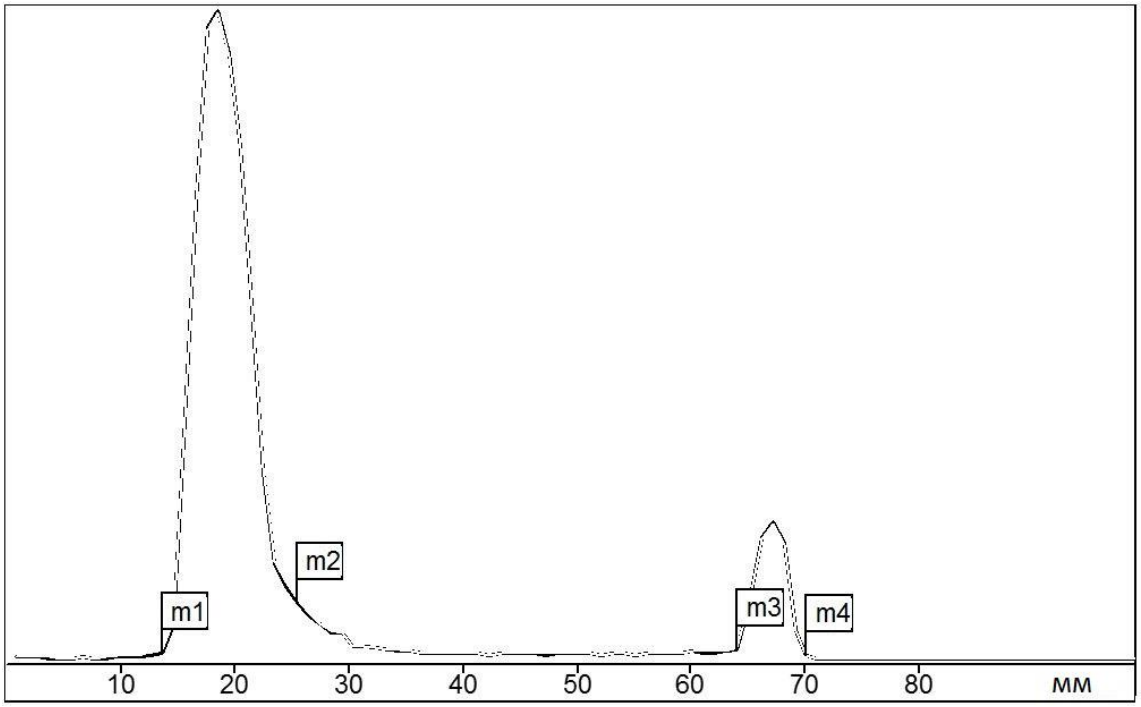



Рисунок 3.7 – Хроматограмма смеси через 90 мин после приготовления РФП.

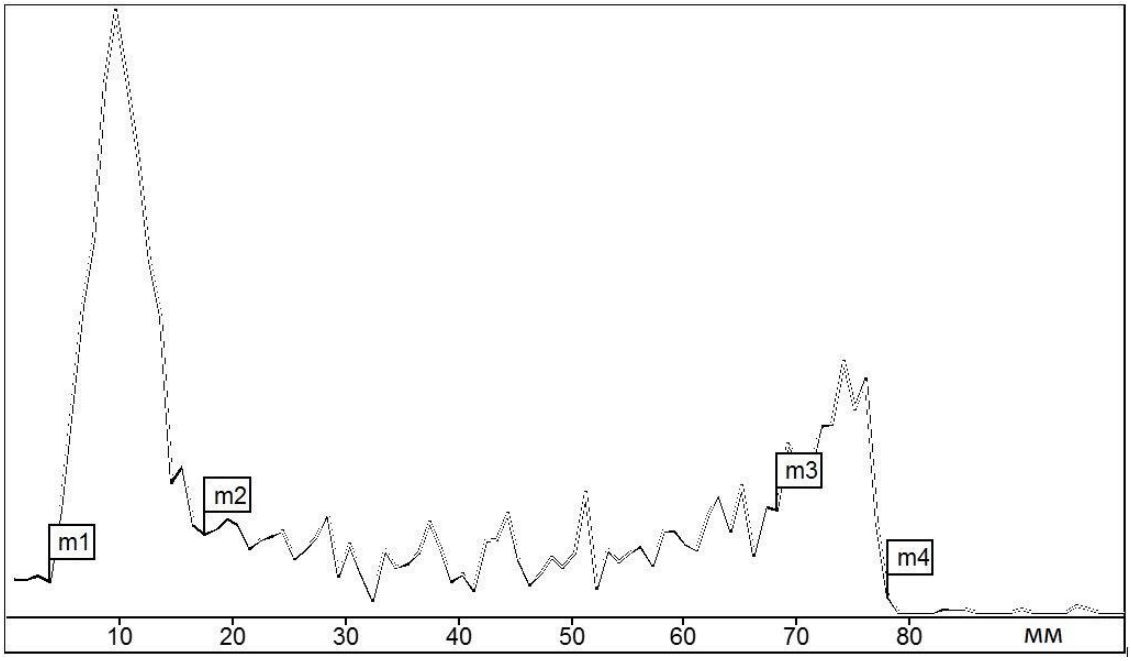



Рисунок 3.8 – Хроматограмма смеси через 120 мин после приготовления РФП.

Представленные данные свидетельствуют о нестабильности приготовленного препарата во времени. Поэтому была исследована возможность повышения его устойчивости путем проведения лиофилизации исходной смеси реагентов с последующим приготовлением на ее основе РФП «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc». Другими словами, исследована возможность получения лиофилизированного реагента для получения РФП «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» с большим сроком годности.

## 3.6 Изучение влияния процесса лиофилизации на качественные характеристики набора реагентов для получения РФП

В соответствии с проведенными выше исследованиями по изучению характера взаимодействия 5-тио-D-глюкозы с радионуклидом технеция-99м в присутствии восстановителя и стабилизирующих добавок, для создания лиофилизированного набора реагентов и выбора режима его приготовления было опробовано несколько программ.

Для проведения лиофилизации был использован лиофилизатор Labconco Free Zone (производство США) объемом 2,5 литра. В качестве стандартных условий, которые могли бы обеспечить достаточную степень сублимационной сушки, были выбраны следующие параметры процесса лиофилизации: уровень вакуума в камере 0,2 Па и температура среды -50 ºС. При этом варьировались следующие показатели:

- время проведения основной сушки,
- время досушивания в верхней камере (см. раздел 1.3),
- наличие предварительной заморозки исследуемой смеси.

Все исследуемые смеси реагентов готовили во флаконах объемом 10 мл. Затем флаконы укупоривали стерильными резиновыми пробками типа 1-1 и проводили лиофилизацию смесей. После досушивания флаконы завальцовывали алюминиевыми колпачками. Затем в них через пробку вводили элюат технеция-

99м объемом 4 мл, перемешивали и инкубировали полученный препарат в течение 30 мин с последующим отбором проб для снятия хроматограмм.

Полученные по результатам проведенного анализа данные и зависимости изменения радиохимического выхода меченого продукта и его радиохимической чистоты от продолжительности и условий проведения лиофилизации представлены в таблице 3.6. и на рисунке 3.9.

Таблица 3.6 – Результаты исследования

| № | Время предварительной заморозки, ч | Время лиофилизации, ч | Время досушивания, ч | РХВ, % | РХЧ, % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,5 | 21 | 5 | 35,854 | 62,2 |
| 2 | 2 | 21 | 5,5 | 17,911 | 43,0 |
| 3 | - | 22 | 0 | 27,310 | 87,7 |
| 4 | - | 22 | 2,5 | 40,369 | 87,5 |
| 5 | - | 22 | 3,5 | 46,900 | 96,9 |
| 6 | - | 22 | 4,5 | 56,802 | 95,3 |

Из результатов таблицы следует, что пробы с предварительной заморозкой имеют низкий процент по обоим показателям, поэтому было решено исключить данный параметр из программы дальнейших исследований.

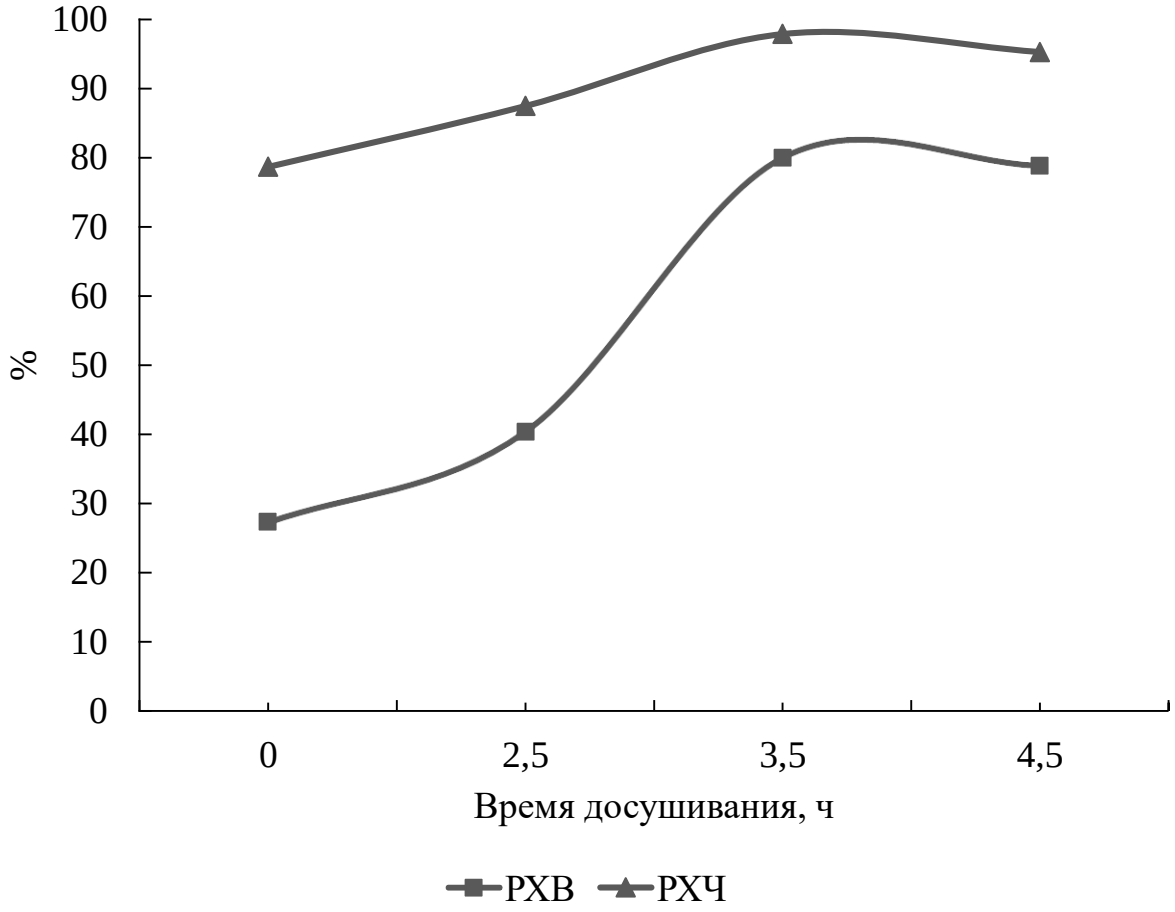



Рисунок 3.9 – Зависимости изменения радиохимического выхода и радиохимической чистоты препаратов от времени досушивания лиофилизатов

Зависимости, представленные на рисунке 3.8, показывают, что с ростом времени досушивания лиофилизатов до 3,5 часов наблюдается увеличение радиохимического выхода и чистоты, получаемых на их основе РФП. Скорее всего, это связано с тем, что при малом количестве времени досушивания происходит не полная сублимация, при которой могут оставаться малые количества несвязанного растворителя (вода), что, как было отмечено ранее (раздел 3.3), может привести к гидролизу ионов двухвалентного олова и к их переходу в четырехвалентное состояние.

Проведенные исследования процесса лиофилизации показали следующее:

– Общий объем лиофилизируемой смеси должен быть не более 1 мл.

– Наличие предварительного замораживания смеси может повлечь за собой образование крупного коллоида, размером более 200 нм.

– Оптимальное время сушки в нижней камере составляет не менее 22 часов.

– Время досушивания в верхней камере должно быть не менее 3,5 часов.

## 3.7 Методика приготовления лекарственной формы РФП «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc»

На основании проведенной предварительной разработки оптимального состава препарата «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc» и условий лиофилизации реагента для его получения, для наработки опытных образцов РФП с целью проведения контроля их качества и изучения функциональной пригодности была использована следующая технологическая схема:

1. Подготовка растворов для приготовления смеси реагентов, входящих в состав лиофилизата, включая 5-тио-D-глюкозу и вспомогательные вещества: двухвалентное олово, аскорбиновую кислоту, соляную кислоту (согласно методикам, описанным в разделе 2.2).
2. Фасовка всех компонентов во флаконы для лекарственных средств.
3. Лиофилизирование смесей.
4. Введение в лиофилизат элюата технеция-99м.
5. Проведение инкубирования растворов смесей в ультразвуковой ванне при комнатной температуре.
6. Стерилизация полученных препаратов путем пропускания через фильтр с диаметром пор 200 нм.
7. Радиометрическое определение выхода меченого комплекса и радиохимической чистоты РФП.

В соответствии с разработанной технологической схемой, во флаконы вместимостью 10 мл вводили по 1 мл раствора 5-тио-D-глюкозы, содержащего 15 мг субстанции в 1 мл воды для инъекций, 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 $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (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 ºC, и уровнем вакуума P = 0,2 Па, процесс сушки проводили в течение 24 ч. Затем проводилось досушивание в верхней лиофильной камере при том же режиме в течение 4 ч.

Для приготовления препарата «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» в полученные лиофилизаты вводили по 4 мл элюата $^{99m}$Tc с активностью 1,0 – 1,5 ГБк, далее смеси инкубировали при комнатной температуре в ультразвуковой ванне в течение 30 мин. По окончанию процесса из флаконов отбирали пробы препаратов объемом 5 мкл для хроматографирования и радиометрических измерений.

Получаемый в результате выполнения такой последовательности операций препарат «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» имеет объем 4 мл. Его состав представлен в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Состав РФП «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» во флаконе

| **Вещество** | **Флакон готового препарата содержит** |
|---|---|
| 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 |

Готовый препарат представляет собой бесцветную прозрачную жидкость и имеет значение pH 4,5. Его радиохроматограмма приведена на рисунке 3.10.

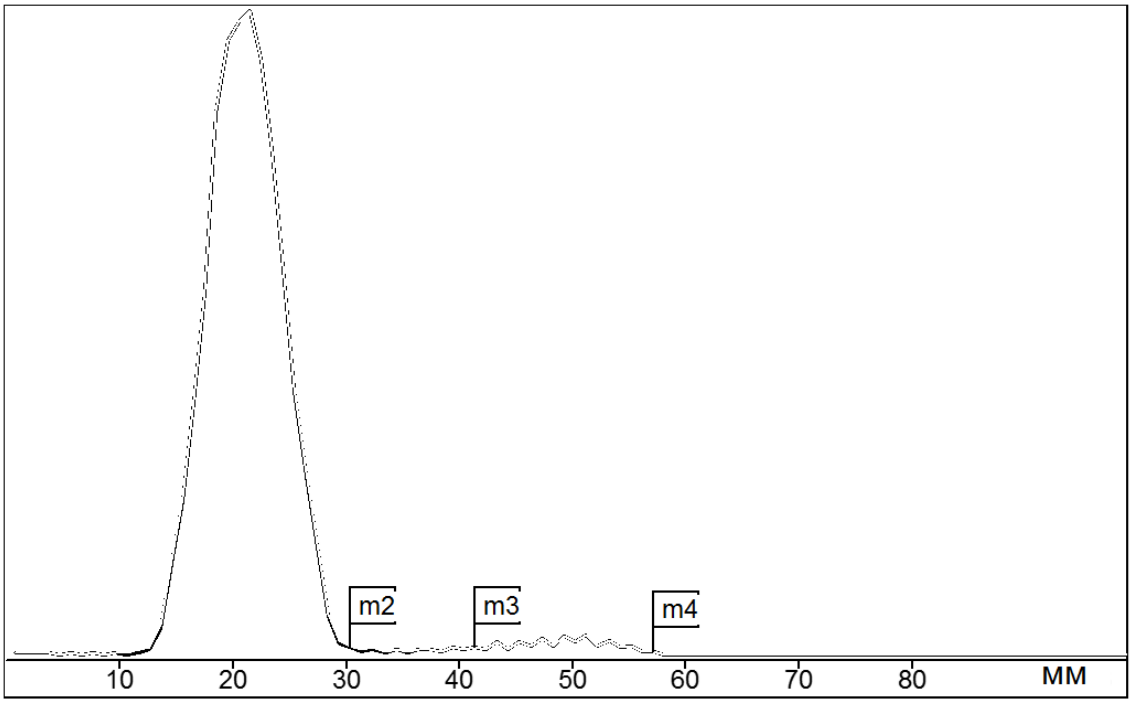



Рисунок 3.10 – Радиохроматограмма препарата: лиофилизат [15мг 5-ТДГ + 1 мл $H_2O$ + 25 мкл Sn(II) + 50 мкл АК + 200 мкл 0,05М HCl] + 4 мл РФП «Натрия пертехнетат,$^{99m}$Tc», подвижная фаза – ацетон

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

## 3.8 Выводы по главе

1. На основе литературных данных произведена проверка существующих методов мечения 5-тио-D-глюкозы технецием-99м. Проверка показала недостаточную стабильность получаемых препаратов. Срок их годности не превышает 1-2 часов, вследствие окисления и гидролиза ионов олова.

2. Проведены исследования по изучению растворимости 5-тио-D-глюкозы в 7 различных средах. Установлено, что эта субстанция достаточно хорошо растворима в физиологическом растворе и воде для инъекций, что облегчает задачу разработки и создания на ее основе меченного $^{99m}$Tc радиофармацевтического препарата для внутривенного введения.

3. Выбран и исследован восстанавливающий агент для создания радиофармацевтического препарата на основе 5-тио-D-глюкозы. Установлено, что степень восстановления $^{99m}$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.

4. Проведены эксперименты по подбору состава подвижных фаз для радиохроматографических исследований меченной технецием-99м 5-тио-D-глюкозы и продуктов ее синтеза. Экспериментально установлено, что 5-TDГ перемещается в среде «ЭТ» вместе с фронтом растворителя. Отмечено, что в этой же подвижной фазе вместе с фронтом перемещается и примесь невосстановленного $^{99m}$Tc(VII), в то время как восстановленный $^{99m}$Tc(IV) и его оксид $^{99m}TcO_2$ остаются на линии старта. Напротив, в среде ацетона «Ац» вместе с фронтом перемещается только примесь невосстановленного $^{99m}$Tc(VII), а меченая 5-тио-D-глюкоза остается на линии старта.

5. Разработан количественный состав реагента для получения препарата «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc». Установлены необходимые и достаточные количества основной субстанции, восстанавливающего агента, а также вспомогательных веществ, обеспечивающих выход меченного целевого продукта более 90 % при его радиохимической чистоте не хуже 95 %.

6. Разработана технология приготовления лиофилизата для получения препарата на основе 5-тио-D-глюкозы, включающая стадии подготовки компонентов смеси: растворов двухвалентного олова, аскорбиновой кислоты,

соляной кислоты и воды для инъекций; проведение фасовки реагентов во флаконы для лекарственных средств; лиофилизирование смеси.

7. Получена зависимость радиохимического выхода и радиохимической чистоты меченого целевого продукта от продолжительности процесса лиофилизации. Показано, что объем лиофилизируемой смеси должен быть не более 1 мл; проведение предварительного замораживания смеси может повлечь за собой образование крупного коллоида; оптимальное время сушки составляет 22-25 часов при времени досушивания не менее 3,5 часов.

8. Разработана технология приготовления препарата «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc», включающая стадию введения элюата технеция-99м во флакон с лиофилизатом; инкубацию раствора смеси в ультразвуковой ванне при комнатной температуре; стерилизацию препарата путем фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

# Глава 4 Методы проведения контроля качества РФП «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc» и проведение его лабораторных испытаний

Готовый радиофармпрепарат «5-тио-D-глюкозы, $^{99m}$Tc», как и любой другой препарат, используемый для внутривенного введения, должен проходить аналитический контроль качества, который включает проведение тестов лекарственного средства по различным показателям.

Согласно требованиям, действующего ОСТ «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. № 91500.05.001-00» контроль качества радиофармацевтического препарата, приготовленного из стандартного лиофилизата, путем его смешивания с препаратом, содержащим радионуклид для мечения, должен включать различные тесты на подлинность используемой субстанции и других реагентов, входящих в состав лиофилизата, а также испытания на pH, объемную активность, радиохимическую чистоту, содержание бактериальных эндотоксинов и стерильность вводимого РФП. При этом все определяемые показатели качества препарата и методы их контроля приводятся в Спецификации на РФП, являющейся обязательным разделом фармакопейной статьи на его производство.

Практически все перечисленные показатели определяются по стандартным методикам, описанных в методической части работы или приведенных в Государственной фармакопее Российской федерации, XIII изд., тома 1, 2 и 3 (ГФ XIII) [113]. Вместе с тем, аналитические методики, обычно используемые для определения компонентов, входящих в состав лиофилизата, таких как 5-тио-D-глюкоза, Sn (II) хлорид дигидрат и аскорбиновая кислота, требуют тщательной проверки с учетом возможного взаимного влияния этих компонентов на результаты их определения. В связи с этим, ниже приведено описание выбранных методик.

## 4.1 Качественное и количественное определение 5-тио-D-глюкозы

Для определения производных глюкозы существует несколько методов: фотометрические (в видимой области и УФ-спектре [114]), спектральные (ЯМР-спектроскопия [115] и ИК-спектроскопия [116]), хроматографические [117-119] и электрохимические. Ввиду малой летучести и хорошей растворимости в воде моно- и дисахаридов для их определения наиболее часто применяются методы жидкостной хроматографии и, в частности, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [120] а для полуколичественного определения – метод тонкослойной хроматографии [121].

Для проведения качественного и количественного определения в составе препарата 5-тио-D-глюкозы нами был выбран метод ВЭЖХ. Для хроматографирования использовался жидкостный хроматограф высокого давления «Agilent 1200» – с рефрактометрическим детектором и колонкой Supelcosil LC-NH2 с размером частиц 5 мкм, 4,6x250 мм.

***Методика проведения измерений состоит в следующем:***

Перед началом работы включенный хроматограф прогревают 15 мин. Далее в программное обеспечение хроматографа вводят следующие параметры:

- режим детектирования – рефрактометрический;
- режим элюирования – изократический (подача подвижной фазы в постоянном объемном соотношении);
- необходимое количество анализируемых образцов;
- подвижная фаза – ацетонитрил/вода в объемном соотношении 80/20 без смешивания из двух различных емкостей;
- скорость потока – 1 мл/мин;
- анализируемый объем 10 мкл.

Также в настройках указывают номера ячеек с измеряемыми пробами для их отбора автосамплером.

Далее хроматограф в автоматическом режиме проводит уравновешивание колонки путем введения в нее подвижной фазы в течение 1 часа. После выхода на режим производится анализ исследуемых проб путем их последовательного введения.

Результаты проведенного анализа выводятся на экран в виде хроматограмм и таблиц, в которых отмечаются найденные пики, их площадь (nRIU·s) и время удержания.

***1. Качественное определение*** 5-тио-D-глюкозы состоит в сравнении времени удержания основного пика на хроматограмме определяемого раствора со временем удержания основного пика на хроматограмме стандартного раствора 5-тио-D-глюкоза (приготовление раствора представлено в разделе 2.2), которые должны соответствовать друг другу.

***2. Количественное определение.***

В хроматограф, выведенный на режим с помощью автосамплера, последовательно вводят 10 мкл стандартного раствора и 10 мкл испытуемого раствора. Процедуру повторяют 3 раза. Время записи одной хроматограммы составляет 15 мин. Далее, исходя из установленных величин площадей пиков 5-TDГ в стандартном и испытуемом растворах, проводят расчет содержания 5-тио-D-глюкозы ($C_1$) по формуле:

$$C_1 = \frac{C_{ст} \cdot S_1}{S_{ст}} \cdot 4 \text{ [мг/фл]}, \qquad (4.1)$$

где $C_{ст}$ – содержание 5-тио-D-глюкозы в стандартном образце, мг/мл; $S_1$ – площадь пика 5-тио-D-глюкозы на хроматограмме испытуемого раствора; $S_{ст}$ – площадь пика 5-тио-D-глюкозы на хроматограмме стандартного раствора; 4 – объём раствора реагента во флаконе, мл.

Содержание 5-тио-D-глюкозы в лиофилизированном наборе реагентов должно быть не более 15 мг/фл.

В приведенной методике анализа в состав подвижной фазы входит ацетонитрил, который является сильным растворителем для органических веществ. Поэтому при выполнении процесса жидкостной хроматографии достаточно сложной смеси компонентов лиофилизата, происходит растворение в ацетонитриле не только 5-тио-D-глюкозы, но и аскорбиновой кислоты. В этой связи, важно было оценить влияние на результаты определения 5-TDГ такого сопутствующего реагента, как аскорбиновая кислота.

С этой целью сначала необходимо было выяснить время удерживания раствора 5-TDГ без примесей. Для этого был приготовлен эталонный раствор 5-TDГ с концентрацией 3,75 мг/мл и проведено его хроматографирование по вышеописанной методике. Результаты определения приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Результаты хроматографирования раствора стандарта 5-TDГ с концентрацией 3,75 мг/мл

| № пробы | Концентрация 5-TDГ, мг/мл | Площадь пика 5-TDГ (nRIU·s) | Время удерживания, мин |
|---|---|---|---|
| 1 | 3,75 | 348888,0 | 6,09 |
| 2 | 3,75 | 349218,1 | 6,09 |
| 3 | 3,75 | 347935,8 | 6,10 |
| 4 | 3,75 | 348724,2 | 6,09 |
| 5 | 3,75 | 349812,6 | 6,09 |
| Среднее | - | 348915,7 | 6,09 |

Исходя из таблицы 4.1 следует, что время удерживания эталонного раствора с концентрацией 3,75 мг/мл составляет 6,09 мин.

Далее были проведены анализы проб растворов 5-TDГ, с содержанием и без содержания в своем составе аскорбиновой кислоты (АК). С этой целью были приготовлены два флакона со смесями, имеющими следующий состав:

Проба 1. [15 мг 5-TDГ + 0,5 мг АК + 0,175 мг олова хлорид дигидрат + 200 мкл раствора 0,05 М HCl].

Проба 2. [15 мг 5-TDГ + 0,175 мг олова хлорид дигидрат + 200 мкл раствора 0,05 М HCl].

Количество аскорбиновой кислоты в смеси №1 соответствует ее количеству в лиофилизированном наборе.

После приготовления смесей их объем в обоих флаконах был доведен физраствором до 4 мл. Результаты определения содержания 5-TDГ в этих пробах представлены в таблице 4.2. Все измерения проводились согласно вышеописанной методике.

Таблица 4.2 – Результаты определения содержания 5-тио-D-глюкозы в пробах без аскорбиновой кислоты и с ее присутствием.

| № пробы | Концентрация АК, мг/мл | Площадь пика 5-TDГ (nRIU·s) | Время удержания, мин | Содержание 5-TDГ, мг/фл |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 308560,3 | 6,09 | 13,27 |
| 2 | | 308523,5 | 6,09 | 13,26 |
| 3 | | 309147,0 | 6,10 | 13,29 |
| 4 | | 308800,4 | 6,09 | 13,28 |
| 5 | | 309235,1 | 6,09 | 13,29 |
| **Среднее** | **-** | **308853,3** | **6,09** | **13,28** |
| 1 | 0,125 | 308879,2 | 6,09 | 13,28 |
| 2 | | 308023,1 | 6,10 | 13,24 |
| 3 | | 308744,8 | 6,09 | 13,27 |
| 4 | | 309555,2 | 6,09 | 13,31 |
| 5 | | 308214,0 | 6,09 | 13,25 |
| **Среднее** | **-** | **308683,3** | **6,09** | **13,27** |

Из представленных в таблице 4.2 данных следует, что присутствие в пробах растворов с 5-TDГ аскорбиновой кислоты в количестве до 0,125 мг/мл не влияет на время удержания и площадь пика 5-тио-D-глюкозы на хроматограмме и, соответственно, на результаты ее определения по предложенной методике.

## 4.2 Качественное и количественное определение $SnCl_2 \cdot 2H_2O$

Для определения олова (II) в растворах реагентов могут быть использованы потенциометрический [122], полярографический [123], вольтамперометрический [122] и спектрофотометрический методы [124]. Также может быть применен простой в исполнении хроматографический способ [123].

Для проведения качественного и количественного определения ионов Sn (II) в реагенте для приготовления радиофармпрепарата была использована методика, основанная на реакции взаимодействия Sn (II) с перренатом калия в кислой среде в присутствии роданида калия. Согласно данной методике, определение олова проводили спектрофотометрическим методом по максимальному поглощению на длине волны 353 ± 2 нм в диапазоне от 340 до 370 нм. При проведении измерений использовали спектрофотометр «UNICO» со спектральным диапазоном от 190 до 1100 нм.

***Методика проведения измерений.***

***1. Качественное определение Sn (II).***

Качественное определение олова в составе лиофилизированного реагента заключается в обнаружении максимума спектра поглощения раствора при длине волны 353 ± 2 нм в диапазоне от 340 до 370 нм. С этой целью раствор реагента помещают в кювету спектрофотометра и далее проводят измерения по следующей методике.

В главном меню выбирают режим «Мультиволновой» и устанавливают требуемый диапазон длин волн (область от 340 до 370 нм), а также измеряемый параметр – оптическую плотность D. Для обнуления показаний прибора на пути

светового луча первоначально устанавливают пустую кювету, затем кювету с пробой реагента и производят измерение величины D. Максимальное значение D должно наблюдаться при длине волны 353 ± 2 нм. По окончании измерений результат анализа выводится на экран прибора.

***2. Количественное определение Sn (II).***

Для проведения количественного анализа в главном меню выбирают режим «Количественный анализ», в соответствии с которым определение концентрации веществ осуществляют по стандартным (калибровочным) кривым. С этой целью проводят измерение оптической плотности растворов стандартных образцов с последующим построением калибровочной кривой. Затем проводят измерение образца и по величине его оптической плотности из калибровочной кривой находят содержание в нем определяемого вещества.

Для построения калибровочных графиков выполняют следующие операции: в колбу вместимостью 100 мл вносят 10 мл промежуточного раствора Sn (II) с концентрацией 5 мг/мл и доводят объем до метки 0,1 М раствором HCl в токе инертного газа. Приготовленный стандартный раствор имеет концентрацию 0,5 мг/мл Sn (II).

После этого в шесть мерных колб каждая вместимостью по 50 мл, вводят 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 мл приготовленного стандартного раствора Sn (II), далее объём растворов доводят до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты также в токе инертного газа с последующим перемешиванием смесей. Полученные эталонные растворы имеют следующие концентрации по иону олова (II), мг/мл: 1 - 0,010; 2 - 0,015; 3 - 0,020; 4 - 0,025; 5 - 0,030; 6 - 0,035.

Затем в шесть пробирок каждая вместимостью по 10 мл вводят по 4,1 мл 2 М раствора кислоты хлористоводородной, 0,1 мл 2 М раствора калия роданистого, 0,3 мл 0,006 М раствора калия рениевокислого и по 0,5 мл каждого из эталонных растворов и перемешивают. Через 10 мин после приготовления смесей на спектрофотометре проводят измерение их оптических плотностей в максимуме поглощения при длине волны 353 ± 2 нм в кюветах с толщиной поглощающего

слоя 10 мм. Раствор сравнения содержит в своем составе все те же компоненты в указанных количествах, кроме эталонных растворов, вместо которых вносят 0,5 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.

После строят калибровочный график в координатах: "оптическая плотность-концентрация олова (II) в испытуемых растворах, мг/мл".

*Проведение анализа пробы раствора реагента.*

На первом этапе были приготовлены эталонные растворы по вышеописанной методике и построен калибровочный график в координатах: оптическая плотность – концентрация ионов олова (II) в мг/мл, который представлен на рисунке 4.1.

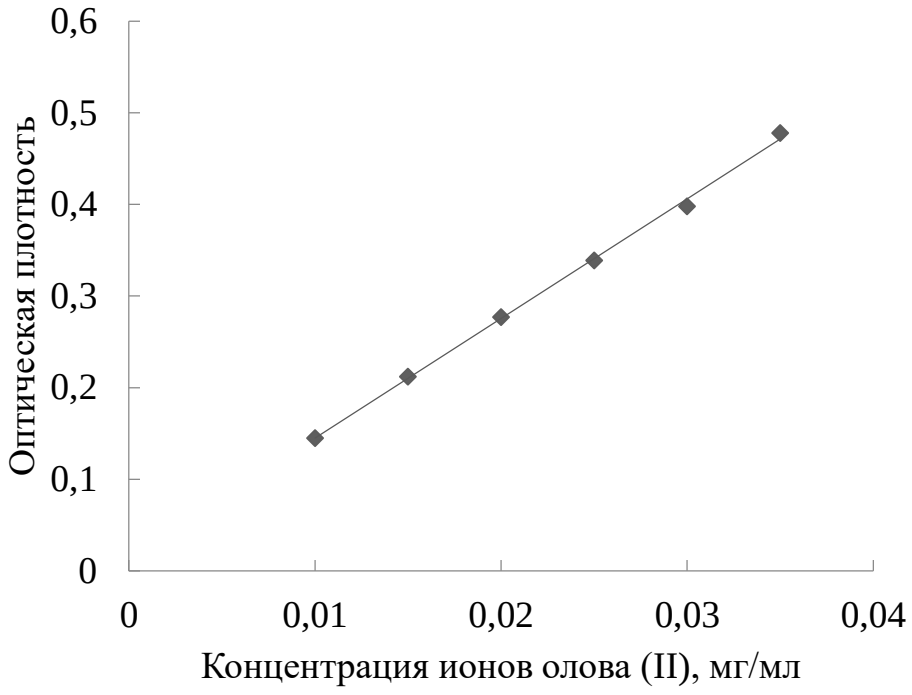



Рисунок 4.1 – Калибровочный график зависимости изменения оптической плотности эталонных растворов от концентрации ионов олова(II)

Для последующего проведения анализа пробы раствора реагента в пробирку вместимостью 10 мл внесли 4,1 мл 2 М раствора HCl, затем ввели 0,3 мл 0,006 М раствора калия рениевокислого, 0,1 мл 2 М раствора калия роданистого, 0,5 мл раствора реагента и тщательно перемешали. Через 10 мин после приготовления

измерили оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 353 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, содержащий все компоненты в указанных количествах, кроме раствора реагента, вместо которого вносили 0,5 мл 0,9% раствора NaCl. Методики приготовления растворов представлены в разделе 2.2.

Содержание $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ ($C_{(Sn)}$) во флаконе с реагентом рассчитывали по формуле:

$$C_{(Sn)} = C_{Sn(II)} \cdot V_{фл} \cdot K \quad [мг] \qquad (4.2)$$

где $C_{Sn(II)}$ – концентрация ионов Sn (II) в испытуемом растворе, которая установлена с помощью калибровочного графика, мг/мл; $V_{фл}$ = 4,0 – объём испытуемого раствора во флаконе, мл; $K$ = 1,90 – пересчетный коэффициент содержания Sn (II) в олово (II) хлорид дигидрате.

*Примечание:* Очень важно, чтобы все растворы (промежуточный, стандартный, эталонные и раствор пробы), были приготовлены непосредственно перед проведением измерений, поскольку ионы Sn(II) весьма неустойчивы и быстро окисляются.

Для повышения точности определении олова в составе реагента для приготовления РФП «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» важно было оценить влияние на результаты анализа других компонентов, присутствующих в смеси: 5-тио-D-глюкозы и аскорбиновой кислоты. С этой целью были проведены измерения проб, имеющих следующий состав:

Проба 1. [15 мг 5-TDГ + 0,5 мг АК + 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$] общий объем раствора доводили до 4 мл.

Проба 2. [0,5 мг АК + 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$] общий объем раствора доводили до 4 мл. В испытуемой смеси отсутствует 5-TDГ.

Проба 3. [15 мг 5-TDГ + 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$] общий объем раствора доводили до 4 мл. В испытуемой смеси отсутствует АК.

Все измерения проводили по вышеописанной методике. Согласно разработанному составу реагента, концентрация олова дихлорида дигидрата в нем должна находиться в пределах 0,141 – 0,175 мг/флакон. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Результаты экспериментального определения концентрации олова дихлорида дигидрата.

| Состав анализируемой смеси | Определенная $C_{Sn(II)}$, мг/мл | Расчетная $C_{Sn}$, мг/фл | Среднее значение $C_{Sn}$, мг/фл |
|---|---|---|---|
| 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ + 0,5 мг АК + 15 мг 5-TDГ | 0,0220 | 0,1672 | 0,1637 |
| | 0,0217 | 0,1649 | |
| | 0,0207 | 0,1573 | |
| | 0,0218 | 0,1657 | |
| | 0,0215 | 0,1634 | |
| 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ + 0,5 мг АК | 0,0213 | 0,1619 | 0,1637 |
| | 0,0216 | 0,1642 | |
| | 0,0217 | 0,1649 | |
| | 0,0212 | 0,1611 | |
| | 0,0219 | 0,1664 | |
| 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ + 15 мг 5-TDГ | 0,0219 | 0,1664 | 0,1642 |
| | 0,0221 | 0,1680 | |
| | 0,0213 | 0,1619 | |
| | 0,0211 | 0,1604 | |
| | 0,0216 | 0,1642 | |

Как видно из представленных результатов, присутствие в анализируемом растворе сопутствующих компонентов, таких как 5-тио-D-глюкоза и аскорбиновая кислота не препятствуют точному определению ионов олова(II) по разработанной методике.

## 4.3 Качественное и количественное определение аскорбиновой кислоты

Для проведения качественного и количественного определения в составе лиофилизата аскорбиновой кислоты была использована методика, приведенная в Европейской фармакопее [125]. Согласно данной методике, определение олова проводят спектрофотометрическим методом в области от 450 до 550 нм при максимальном поглощении на длине волны 510 ± 2 нм.

***Методика проведения измерений.***

***1. Качественное определение***.

Качественное определение аскорбиновой кислоты в составе лиофилизированного реагента состоит в регистрации максимума спектра поглощения раствора, которому должна соответствовать длина волны 510 ± 2 нм. С этой целью приготовленный раствор реагента помещают в кювету спектрофотометра и далее проводят измерения оптической плотности в диапазоне от 450 до 550 нм.

Для проведения измерений использовали спектрофотометр «UNICO» со спектральным диапазоном от 190 до 1100 нм. Методика измерений состояла в следующем. В главном меню спектрофотометра был выбран режим «Мультиволновой», а также установлен диапазон длин волн (область от 450 до 550 нм) и измеряемый параметр – оптическая плотность D. Для обнуления показаний прибора на пути светового луча изначально устанавливали пустую кювету, затем кювету с пробой реагента и проводили измерение оптической плотности. По окончании измерений максимальное значение D высвечивалось на экран прибора.

***2. Количественное определение***

Для количественного определения содержания аскорбиновой кислоты в препарате может быть использован метод титриметрического анализа, в соответствии с которым аскорбиновую кислоту титруют раствором йода известной концентрации. Однако в данном случае такая методика не подходит,

поскольку в составе разработанного лиофилизата присутствует олово (II) хлорида дигидрат, который также будет реагировать с раствором йода. Поэтому для устранения влияния на результаты анализа хлорида олова в работе для количественного определения аскорбиновой кислоты, как и в случае ее качественного определения, была выбрана методика спектрофотометрического анализа с применением спектрофотометра «UNICO».

Для проведения количественного анализа в главном меню выбирают режим «Количественный анализ», в соответствии с которым определение концентрации веществ осуществляют по стандартным (калибровочным) кривым. С этой целью проводят измерение оптической плотности растворов стандартных образцов с последующим построением калибровочной кривой. Затем проводят измерение образца и по величине его оптической плотности из калибровочной кривой находят содержание в нем определяемого вещества.

Для построения калибровочных графиков используются эталонные растворы, процесс приготовления которых включает следующее: в шесть мерных колб каждая вместимостью по 50 мл, вводят 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл стандартного раствора, объем раствора в колбах доводят до метки 1,5 % раствором кислоты ортофосфорной и перемешивают. Полученные эталонные растворы в колбах имеют соответствующие концентрации по аскорбиновой кислоте, мг/мл: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50. Методика приготовления стандартного раствора приведена в разделе 2.2.

После этого в шесть пробирок каждая вместимостью по 5 мл, вводят по 0,5 мл раствора квасцов железоаммонийных, прибавляют по 2,0 мл 10 % раствора натрия цитрата, 0,2 мл 0,1 % раствора о-фенантролина, 2,0 мл воды, перемешивают и прибавляют по 0,3 мл каждого из эталонных растворов и вновь перемешивают. Полученные растворы выдерживают в темном месте в течение 20 мин, после чего немедленно измеряют на спектрофотометре их оптическую плотность в максимуме поглощения при 510 нм, толщина слоя в кювете 10 мм. Раствор сравнения содержит все компоненты в указанных количествах, кроме

эталонных растворов, вместо которого вносят 0,3 мл физиологического раствора. Методы приготовления используемых растворов представлены в разделе 2.2.

Затем строят калибровочный график в координатах: «оптическая плотность – концентрация аскорбиновой кислоты, мг/мл».

*Проведение анализа пробы раствора реагента.*

На первом этапе были приготовлены эталонные растворы по вышеописанной методике и построен калибровочный график в координатах: оптическая плотность – концентрация аскорбиновой кислоты в мг/мл, который представлен на рисунке 4.2.

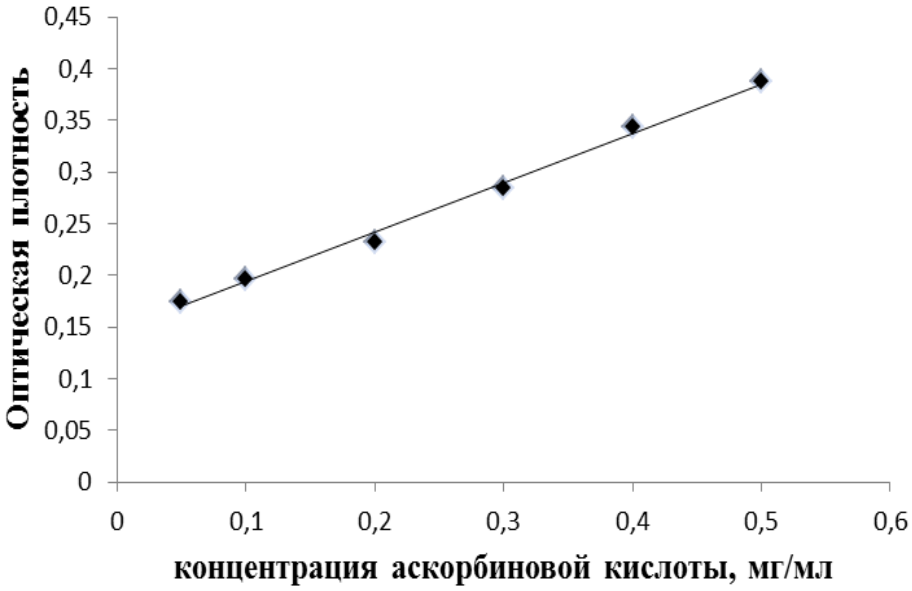



Рисунок 4.2 – Калибровочный график зависимости изменения оптической плотности от концентрации аскорбиновой кислоты в эталонных растворах

Для последующего проведения анализа пробы раствора реагента в пробирку вместимостью 5 мл внесли 0,5 мл раствора квасцов железоаммонийных, затем добавили 2,0 мл 10 % раствора натрия цитрата, 0,2 мл 0,1 % раствора о-фенантролина, 2,0 мл воды и тщательно перемешали. После ввели 0,3 мл раствора реагента и вновь перемешали. Полученный раствор выдержали в темном

месте в течение 20 мин, после чего измерили его оптическую плотность на спектрофотометре в максимуме поглощения при 510 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, содержащий все компоненты в указанных количествах, кроме раствора реагента, вместо которого ввели 0,3 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций.

Содержание кислоты аскорбиновой во флаконе ( $C_{АК}$ ) в миллиграммах вычисляют по формуле:

$$C_{АК} = C \cdot 4 \text{ [мг]}, \quad (4.3)$$

где C – концентрация кислоты аскорбиновой, установленная с помощью калибровочного графика в мг/ мл; 4,0 – объем раствора лиофилизата в миллилитрах.

Для повышения точности определения аскорбиновой кислоты в составе реагента были проведены эксперименты по оценке влияния на результаты анализа присутствующих в смеси компонентов: 5-тио-D-глюкоза и олова (II) хлорида дигидрат. С этой целью были проведены измерения проб, имеющих следующий состав:

Проба 1. [15 мг 5-TDГ + 0,5 мг АК + 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$] общий объем раствора доводили до 4 мл.

Проба 2. [0,5 мг АК + 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$] общий объем раствора доводили до 4 мл. В испытуемой смеси отсутствует 5-TDГ.

Проба 3. [15 мг 5-TDГ + 0,5 мг АК] общий объем раствора доводили до 4 мл. В испытуемой смеси отсутствует олова (II) хлорида дигидрат.

Все измерения проводили по вышеописанной методике. Согласно разработанному составу реагента, концентрация аскорбиновой кислоты не должна превышать 0,5 мг на флакон. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Результаты экспериментального определения концентрации аскорбиновой кислоты

| Состав анализируемой смеси | Измеренная $C_{АК}$, мг/мл | Расчетная $C_{АК}$, мг/фл | Среднее значение $C_{АК}$, мг/фл |
|---|---|---|---|
| 0,5 мг АК + 15 мг 5-TDГ + 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,122 | 0,488 | 0,491 |
| | 0,123 | 0,492 | |
| | 0,125 | 0,500 | |
| | 0,121 | 0,484 | |
| 0,5 мг АК + 0,175 мг $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,123 | 0,496 | 0,490 |
| | 0,122 | 0,488 | |
| | 0,120 | 0,480 | |
| | 0,125 | 0,500 | |
| 0,5 мг АК + 15 мг 5-TDГ | 0,124 | 0,496 | 0,492 |
| | 0,125 | 0,500 | |
| | 0,120 | 0,480 | |
| | 0,123 | 0,492 | |

Как видно из представленных результатов, присутствие в анализируемом растворе сопутствующих компонентов, таких как 5-тио-D-глюкоза и хлорид дигидрат олова не препятствуют точному определению аскорбиновой кислоты по разработанной методике.

## 4.4 Проект спецификации на РФП «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc»

Основываясь на проведенных в работе исследованиях по разработке состава радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc», а также приведенных выше методик анализа его качества, был разработан проект Спецификации для наработки опытных партий РФП, представленный в таблице 4.5.

Таблица 4.5 – Спецификация на РФП «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc», раствор для внутривенного введения

| Показатели | Методы контроля | Описание норм |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| **Лиофилизат** | | |
| Описание | Визуальный | Лиофилизат белого цвета в виде порошка или пористой массы. |
| Растворимость | ГФ XIII | Содержимое флакона должно растворяться в 4,0 мл изотонического 0,9% раствора натрия хлорида. Время растворения не более 60 сек. |
| Подлинность | ВЭЖХ | Время удержания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удержания основного пика на хроматограмме стандартного раствора 5-тио-D-глюкоза. |
| | УФ-спектрофото-метрия | УФ-спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения олова дихлорида дигидрата, в области длин волн от 340 до 370 нм должен иметь максимум при 353 ± 2 нм. |
| | УФ-спектрофото-метрия | УФ-спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения аскорбиновой кислоты, в области длин волн от 450 до 550 нм должен иметь максимум при 510 нм ± 2 нм. |

*Продолжение таблицы 4.5*

| Показатели | Методы контроля | Описание норм |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Прозрачность раствора | ГФ XIII | Раствор должен быть прозрачным. |
| Цветность раствора | ГФ XIII | Раствор должен быть бесцветным. |
| pH | Потенциометрия ГФ XIII | От 3,5 до 4,5 |
| Механические включения | РД 42-501-98 | Соответствует требованиям РД[1]. |
| 5-тио-D-глюкоза | ВЭЖХ ГФ XIII | не более 15 мг/фл |
| Олова хлорида дигидрат | Спектрофото-метрия ГФ XIII | От 0,141 – 0,175 мг/фл |
| Аскорбиновая кислота | Спектрофото-метрия ГФ XIII | не более 0,5 мг/фл |
| Бактериальные эндотоксины | ГФ XIII | Соответствует ГФ. |
| Стерильность | ГФ XIII | Должен быть стерильным. |

[1] РД - РД 42-501-98 «Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств».

*Продолжение таблицы 4.5*

| Показатели | Методы контроля | Описание норм |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Упаковка | - | Используют флаконы для лекарственных средств вместимость 10 мл (ТУ 9461-010-00480514-99). Флаконы герметично укупоривают пробками резиновыми (ТУ 38.106618-19 Тип I-I или УЛ-1А) и обжимают колпачками алюминиевыми (ГОСТ Р51314-99). На флаконы наклеивают этикетки из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625-86). |
| Маркировка | - | Должна соответствовать ФСП. |
| Транспортирование | - | В соответствии с ГОСТ 17768-90. |
| Хранение | ГФ XIII | В темном месте.<br>При температуре от $2^0$С до $6^0$С. |
| Срок годности | ГФ XIII | 3 месяца с даты изготовления. |
| **Радиофармпрепарат «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc»** | | |
| Описание | Визуальный | Бесцветная прозрачная жидкость. |
| pH | Потенциометрия<br>ГФ XIII | От 4,5 до 6,5 |
| Объемная активность | Радиометрия | 1120 – 2000 МБк/фл<br>на дату и время изготовления. |
| Радиохимическая чистота | ТСХ на силикагеле, радиометрия | Более 95% |

*Продолжение таблицы 4.5*

| Показатели | Методы контроля | Описание норм |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Хранение | - | Должно соответствовать «Основным санитарным правилам обеспечения радиационной безопасности» (ОСПОРБ-99/2010) |
| Срок годности | - | Не более 2 ч с момента времени приготовления. |
| Меры предосторожности | - | Должно соответствовать «Основным санитарным правилам обеспечения радиационной безопасности» (ОСПОРБ-99/2010) |

## 4.5 Проведение испытаний препарата на лабораторных животных

Оценку функциональной пригодности РФП «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc» и изучение характера его распределения в организме экспериментальных животных проводили с использованием гамма-камеры методом планарной сцинтиграфии в отделении радионуклидной диагностики Томского НИИ онкологии.

В качестве биологической модели опухоли использовались прививаемые мышам злокачественные новообразования – карцинома легких Льюиса (Банк клеточных линий РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва). Эксперимент выполнялся в соответствии с положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях.» (Страсбург, 18 марта 1986) [126], на 20 мышах линии C57BL/6 с карциномой Льюиса (LLC), привитой в область бедра (рисунок 4.3). На момент исследования масса животных составляла 30–35 г. Средний объем опухолевого узла, измеренный инструментально, составлял 2,3 ± 0,7 см$^3$. Все инвазивные

манипуляции с животными проводили с применением ингаляционного или медикаментозного наркоза.

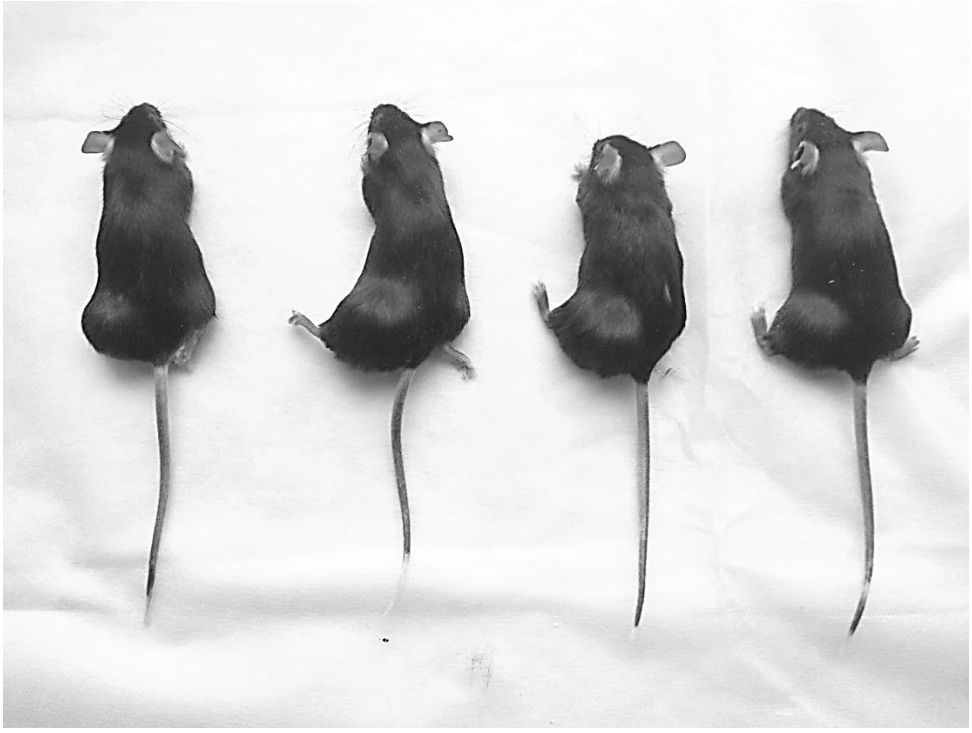


Рисунок 4.3 – Экспериментальные животные: мыши линий C57BL/6 с привитой в область левого бедра карциномой Льюиса (LLC).

Для проведения исследований было приготовлено 5 партий препарата «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc» по 4 флакона. Радиофармпрепарат с объемной активностью 150 МБк/мл вводился мышам внутривенно по 0,1 мл. Статическая сцинтиграфия всего тела животных выполнялась на гамма-камере E.CAM Signature $180^0$ (Siemens, Германия) с низкоэнергетическим высокоразрешающим коллиматором, с последующей обработкой полученных данных с использованием пакета специализированных программ Esoft 5.5 (Siemens, Германия), при настройке дифференциального дискриминатора фотопик 140 КэВ, при ширине окна 20%. В момент исследования животных располагали горизонтально к поверхности детектора гамма-камеры.

Сцинтиграммы тела животного, полученные через 30 и 60 мин после введения РФП представлены на рисунках 4.4 и 4.5.

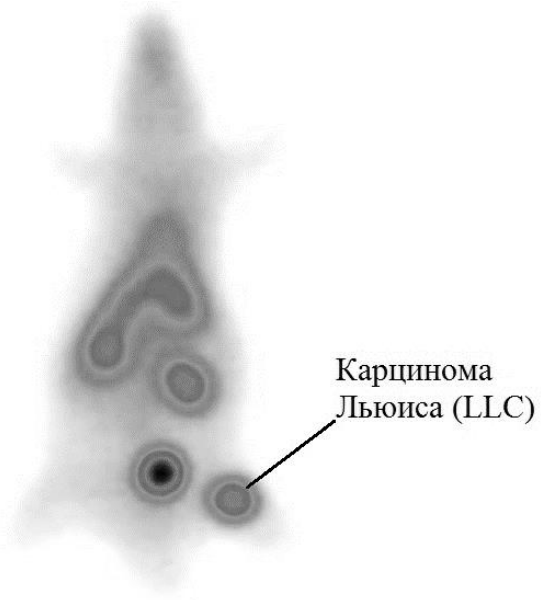



Рисунок 4.4 – Распределение РФП в организме экспериментального животного через 30 мин после введения препарата

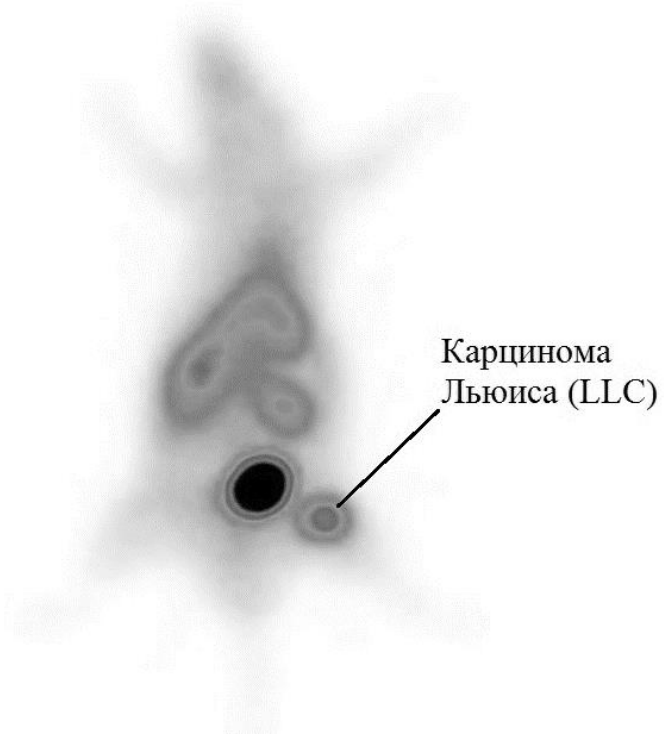



Рисунок 4.5 – Распределение РФП в организме экспериментального животного через 60 мин после введения препарата.

На представленных сцинтиграммах отчетливо визуализируется опухоль на бедре левой задней конечности.

В таблице 4.6 представлены средние значения накопления радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» в опухоли в сравнении с правой (здоровой) задней конечностью (симметричный участок).

Таблица 4.6 – Средние значения накопления РФП в опухоли относительно его накопления на симметричном участке и во всем теле

| № партии | Опухоль | Симметричный участок | Все тело | % превышения симметричного участка | % от всего тела |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 2154,72 | 811,22 | 31875,04 | 265,61 | 6,76 |
| 2. | 2096,43 | 826,02 | 31881,40 | 253,80 | 6,58 |
| 3. | 1995,67 | 805,16 | 32758,06 | 247,86 | 6,09 |
| 4. | 2044,86 | 814,10 | 31447,67 | 251,18 | 6,50 |
| 5. | 2073,02 | 821,40 | 31986,10 | 252,38 | 6,48 |

Из таблицы следует, что уровень накопления препарата в опухоли, расположенной на бедре левой задней конечности, в среднем составил 6,5 %, что является достаточным для визуализации. Полученные результаты удовлетворяют стандартным требованиям [127] к радиофармацевтическим препаратам подобного действия (6 – 7%), что доказывает функциональную пригодность полученного нами препарата на основе 5-тио-D-глюкозы, меченной $^{99m}$Tc.

## 4.6 Выводы по главе

1. Разработаны методы аналитического контроля качества радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» согласно ОСТ «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. № 91500.05.001-00», а также ОСТ 42-510-98 «Правила организации производства и контроля качества

лекарственных средств (GMP)». 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.

2. Предложен проект Спецификации для наработки опытных партий нового отечественного радиофармпрепарата, как основного раздела при подготовке фармакопейной статьи (ФСП) на производство лекарственного средства.

3. Проведены испытания препарата «5-тио-D-глюкозы, $^{99m}$Tc» на его функциональную пригодность. 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.

## Заключение

Проведя анализ состояния дел по мировому производству и применению радиофармпрепаратов на основе меченных радионуклидами производных глюкозы, можно сказать, что на сегодняшний день для диагностики в онкологии используются, главным образом, препараты глюкозы, меченные $^{18}F$, $^{11}C$ и другими радионуклидами, предназначенными для проведения позитрон-эмиссионной томографии. В тоже время, практически отсутствуют или находятся на уровне лабораторных разработок аналогичные РФП на основе более доступного и широко используемого в медицине радионуклида технеция-99м. Применение таких препаратов в ОФЭКТ-центрах, оснащенных гамма-камерами и имеющихся во всех регионах страны, позволило бы значительно увеличить количество обследований населения с одновременным снижением стоимости диагностических процедур.

В настоящее время известны работы, в которых предпринимаются попытки создания препаратов различного состава на основе меченных $^{99m}Tc$ производных D-глюкозамина, 1-тио-D-глюкозы и, в том числе, 5-тио-D-глюкозы. Однако методики получения препарата в представленных работах реализуются в основном путем приготовления состава смеси непосредственно перед его введением. Это во многом обусловлено свойствами используемого для восстановления $^{99m}Tc$ двухвалентного олова, который быстро окисляется и гидролизуется в водных средах.

Для решения указанной проблемы в диссертационной работе впервые была проведена разработка реагента для создания препарата на основе 5-тио-D-глюкозы в виде стандартного лиофилизата с большим сроком годности и, как следствие, возможностью его транспортировки и поставки в другие клиники. Для этого необходимо было решить следующие задачи: провести экспериментальную проверку существующих методов мечения технецием-99м производной 5-тио-D-глюкозы на стабильность получаемых препаратов. Подобрать восстанавливающий агент и условия восстановления $^{99m}Tc(VII)$ с целью его

последующего введения в структуру 5-тио-D-глюкозы. Выбрать системы подвижных фаз для радиохроматографических исследований радиофармпрепарата. Разработать качественный и количественный состав реагентов и условия проведения синтеза 5-тио-D-глюкозы с высоким радиохимическим выходом и радиохимической чистотой целевого меченого продукта. Разработать технологию изготовления набора реагентов в виде лиофилизата, включающую проведение исследований влияния вспомогательных веществ и режимов замораживания на процесс получения и качество разработанного препарата. Подобрать и опробовать методики проведения контроля качества синтезированного препарата «5-тио-D-глюкоза, $^{99m}$Tc» и создать проект Спецификации для наработки его опытных партий. Провести медико-биологические испытания синтезированного радиофармпрепарата на основе 5-тио-D-глюкозы на экспериментальных животных и исследовать его функциональную пригодность.

Полученные результаты проведенных исследований диссертационной работы дают возможность сформулировать следующие 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 $^{99m}$Tc радиофармпрепарата для внутривенного введения.

2. При исследовании влияния восстанавливающего агента Sn(II) дихлорида на процесс введения радиоактивной метки $^{99m}$Tc в структуру 5-тио-D-глюкозы было установлено, что степень восстановления $^{99m}$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 меченной 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 $^{99m}$Tc(VII), в то время как восстановленный $^{99m}$Tc(IV) и его оксид $^{99m}TcO_2$ остаются на линии старта. Напротив, в среде ацетона «Ац» с фронтом растворителя перемещается только примесь невосстановленного $^{99m}$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,$^{99m}$Tc» были определены необходимые и достаточные количества основной субстанции, восстанавливающего агента, а также вспомогательных веществ, обеспечивающих выход меченного 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,$^{99m}$Tc» и проведен аналитический контроль его качества согласно действующим ОСТ «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. № 91500.05.001-00» по показателям «pH», «Радиохимическая

примесь», «Объемная активность», «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,$^{99m}$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.

Практическое применение РФП на основе меченой технецием-99м 5-тио-D-глюкозы позволит производить визуализацию опухоли с помощью гамма-камеры, что может значительно снизить стоимость процедуры диагностики. Использование такого радиофармпрепарата обеспечит возможность проводить изучение биохимических процессов, протекающие в организме, на молекулярном уровне и получать информацию по уникальности и достоверности не уступающую ПЭТ-исследованиям. Создание нового РФП «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc» позволит увеличить количество высокоинформативных диагностических исследований в онкологии. Все это, в свою очередь, позволит выявлять злокачественные новообразования на ранних стадиях их развития и будет способствовать значительному снижению демографических потерь, связанных с изменением качества жизни и потерей трудоспособности населения.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследования заключаются в наработке опытных партий для проведения доклинических испытаний и микробиологических исследований разработанного радиофармпрепарата «5-тио-D-глюкоза,$^{99m}$Tc», а также разработка методик контроля качества препарата на его стерильность.

## Благодарности

Автор выражает свою благодарность своим коллегам – сотрудникам лаборатории №31 ядерного реактора Национального исследовательского Томского политехнического университета за помощь и содействие в проделанной работе, особенно Стасюк Е.С.

Также автор выражает благодарность сотрудникам отделения радионуклидной диагностики Томского НИИ Онкологии в проведении медико-биологических испытаний разработанного радиофармацевтического препарата.

Особую благодарность автор выражает своему наставнику – научному руководителю, профессору, доктору технических наук Скуридину Виктору Сергеевичу за его помощь, бесценные советы и предоставленный им научный опыт в разработке РФП.

## Список литературы

1. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Государственный доклад «Доклад о состоянии здоровья населения и организации здравоохранения по итогам деятельности органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации за 2014 год». Опубликован 18 июня 2015 г. [Электронный ресурс] URL: http://www.rosminzdrav.ru/ministry/programms/doklad-o-sostoyanii-zdorovya-naseleniya-i-organizatsii-zdravoohraneniya-po-itogam-deyatelnosti-organov-ispolnitelnoy-vlasti-sub-ektov-rossiyskoy-federatsii-za-2014-god (Дата обращения 01.03.2016г.).

2. Федеральная служба государственной статистики (РОССТАТ) Доклад «Социально-экономическое Положение России» 2015 год, г. Москва. № ИМ-04-1/30-СД. Опубликован 09.02.2016 г. [Электронный ресурс] URL: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/publications/catalog/doc_1140086922125 (Дата обращения 16.03.2016г.).

3. Проект доклада Министра здравоохранения и социального развития РФ Татьяны Голиковой по развитию ядерной медицины на заседании Комиссии по модернизации и технологическому развитию при Президенте РФ Опубликован 30.04.2010г. [Электронный ресурс] URL: http://www.zdrav.ru/articles/18753-proekt-doklada-ministra-zdravoohraneniya-i-sotsialnogo-razvitiya-rf-tatyany-golikovoy-po (Дата обращения 16.03.2016г.).

4. Hsu P.P., Sabatini D.M. Cancer Cell Metabolism: Warburgand Beyond // Cell. – 2008. – V.134. – p.703-707.

5. Alessandro An., Christian W. Glucose metabolism in cancer cells // Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. – 2010. – №13. – p.466–470.

6. Цатурова К.Н. Позитронно-эмиссионная томография с $^{18}$F-фтордезоксиглюкозой: место в диагностике нейродегенеративных заболеваний // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2015. – Том 5. – № 12. – с. 1681 – 1683.

7. Тютин Л.А., Станжевский А.А., Костеников Н.А., Рыжкова Д.В., Тлостанова М.С., Фрейдман Д.Б., Арзуманов А.С., Павловский А.В. Роль позитронной эмиссионной томографии с $^{18}$F-2-дезокси-d-глюкозой в оценке эффективности лечения злокачественных опухолей различной локализации // Журнал Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – Выпуск № 1-2. – Том 15. – 2004. – с.221.

8. Номори Х., Ватанабе К., Оцука Т., Наруке Ц., Суемасу К., Кобаяши Т., Уно К., Роль позитронной эмиссионной томографии с фтордезоксиглюкозой в диагностике метастазов в лимфатические узлы и оценке опухолевой инвазии при аденокарциноме легкого клинической стадии T1N0M0 // Журнал Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – Выпуск № 4. – Том 15. – 2004. – с.104.

9. Ганжур О. Доклад «Изотопы в комплексе». Опубликован 01.10.2015г. [Электронный ресурс] URL: http://atomicexpert.com/content/izotopy-v-komplekse (Дата обращения 16.03.2016г.)

10. Межрегиональная общественная организация «Общество ядерной медицины», Корсунский В. Н., Доклад «Перспективы ядерной медицины в Госкорпорации «Росатом»: возрождение Российского Общества Ядерной Медицины» Опубликован 09.04.2014г. [Электронный ресурс] URL: http://atomicexpert.com/sites/default/files/library-pdf/120604%20-%20Корсунский%20-%20Перспективы%20ядерной%20медицины%20в%20ГК%20Росатом.pdf (Дата обращения 16.03.2016г.)

11. Perret P., Ghezzi C., Mathieu J. P., Morin C., Fagret D. Assessment of insulin sensitivity in vivo in control and diabetic mice with a radioactive tracer of glucose transport: [$^{125}$I]-6-deoxy-6-iodo-D-glucose // Diabetes/Metabolism Research and Reviews. – 2003. – №19. – p.306–312.

12. Liu Zh., Stevenson G.D., Barrett H.H., Kastis G.A., Bettan M., Furenlid L.R., Wilson D.W., Woolfenden J.M., Pak K.Y. $^{99m}$Tc glucarate high-resolution imaging of drug sensitive and drug resistant human breast cancer xenografts in SCID mice // Nuclear Medicine Communications. – July 2004. – №25(7). – p.711–720.

13. Sadeghzadeh M., Charkhlooiea Gh., Daha F.J. Synthesis, Radiolabeling and Biological Evaluation of $^{99m}$Tc-labeled Deoxyglucose Derivatives for Molecular Imaging // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. - 2013. - №12 (3). – p.273-280.

14. Markoe A.M., Risch V.R., Heindel N.O., Emrich J., Lippincott W., Honda T., Brady L.W. Biodistribution and Pharmacokinetics of S-35-labeled 5-thio -D-glucose in Hamsters Bearing Pancreatic Tumors // Journal of Nuclear Medicine. – 1979. – №20. – p.753–760.

15. Welling M.M., Alberto R. Performance of a $^{99m}$Tc-labelled 1-thio-b-D-glucose 2,3,4,6-tetra-acetate analogue in the detection of infections and tumors in mice: a comparison with [$^{18}$F]FDG // Nuclear Medicine Communications. – 2010. – Vol 31. – No 3. – p.239-248.

16. Петриев В.М., Брюханова А.А., Сирук А.А., Скворцов В.Г. Изучение влияния концентрации $Sn^{2+}$ на динамику связывания $^{99m}$Tc с аминоглюкозой // Труды регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. АНО КРНЦ, РФФИ. – Калуга. – 2010. – № 15. – С. 120-124.

17. Петриев В.М., Брюханова А.А., Сирук О.А., Рыжикова Т.П., Скворцов В.Г. Разработка научных и технологических основ создания радиофармпрепаратов с использованием аминоглюкозы и радионуклидов технеция-99м и рения-188 // Труды регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. АНО КРНЦ, РФФИ. – Калуга. – 2011. – № 16. – С. 151-156.

18. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Ильина Е.А., Чернов В.И., Нестеров А.А., Рогов А.С., Слепченко Г.Б., Гановичев Д.А., Чикова И.В. Изучения процесса взаимодействия производных глюкозы с радионуклидом технеций-99м // Известия вузов. Физика. – 2013. – Т.56. – № 11/3. – С.221-227.

19. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Ильина Е.А., Рогов А.С., Ларионова Л.А. Получение меченных технецием-99м производных глюкозы // Известия вузов. Физика. – 2014. – Т.57. – №11/2. – С. 221-226.

20. Скуридин В.С., Ильина Е.А., Стасюк Е.С., Рогов А.С., Нестеров Е.А., Садкин В.Л., Ларионова Л.А. Получение нового радиофармпрепарата на основе D-глюкозамина меченного технецием-99м // Известия вузов. Физика. – 2015. – Т.58. – № 2/2. – С. 148-152.

21. Rogov A.S., Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Sadkin V.L., Ilina E.A. Receiving radioactive derivatives glucose for diagnosis oncological disease // Book of Abstracts. The seventh Eurasian Conference «Nuclear science and its application». – Baku, Azerbaijan. – 2014. – p.325.

22. Rogov A.S., Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Ilyina E.A. Obtaining Technetium-99m-Labeled Glucose Derivatives // Advanced Materials Research: Radiation and nuclear techniques in material science. – 2015. – Vol. 1084. – p. 567-571.

23. Березовский В.В. Углеводы: номенклатура и строение. – Минск: Изд-во БГУ. – 31 с.

24. Шорыгин П.П. Химия углеводов. 2-е изд., изм. и доп. – Москва-Ленинград: Госхимтехиздат. – 1932. – с.251.

25. Яцюк В.Я., Зубкова И.В. Основы биоорганической химии // Учебное пособие для студентов лечебного, педиатрического и медико-профилактического факультетов. – Курск: ГОУ ВПО КГМУ Росздрава. – 2010. – с.248.

26. Биохимия: Учеб. для вузов, Под ред. Е.С. Северина. – 2003. – 779 с.

27. Моррисон Р., Бойд Р. Органическая Химия. Перевод с англ. М.: Мир, 1974. - 1133 с.

28. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2-х томах. Пер. с англ.: – М.: Мир, 1993. – Т. 1. – 384 с.

29. Новокшанова А.Л. Биохимия для технологов. Учебник и практикум для академического бакалавриата. – М.: Юрайт, 2015. – 508 с.

30. Спортивная биохимия: учебник для вузов и колледжей физической культуры / С.С. Михайлов. – 3-е изд., изм. И доп. – М.: Советский спорт, 2006. – 260 с. : ил.

31. Клиническая патофизиология: учебник / П.Ф. Литвицкий. – М.:Практическая медицина, 2015. – 776 с.

32. Mazurek S., Boschek C.B., Eigenbrodt E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. // Journal of Bioenergetics and Biomembranesю – 1997. – V.29. –p. 315–330.

33. Литвинский П.Ф. Патофизиология. Том 2 – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 752 с.

34. Национальное руководство по радионуклидной диагностике под ред. Ю.Б. Лишманова, В.И. Чернова – Т.1.: Томск, изд. SST-2010 – с.285.

35. Baum R.P., Schmuecking M., Bonnet R. et all. F-18 FDG PET for metabolic 3D-radiation treatment planning of non-small cell lung cancer. // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2002. – Vol.43. – P. 96-99.

36. Gould M.K., Maclean C.C., Kuschner W.G. et all. Accuracy of positron emission tomograpty for diagnosis of pulmonary nodules and mass lesions – a meta – analysis // JAMA. – 2001. – Vol.285. – p. 914-924.

37. Herber G.J., Golding R.P., Hoekstra O.S. The performance of (18) F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in small solitary pulmonary nodules // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2004. – Vol. 31. – p. 1231-1236.

38. Matthies A., Hickeson M., Cuchiara A. Dual time point F-18-FDG PET for the evaluation of pulmonary nodules // Journal of Nuclear Medicine. – 2002. – Vol.43. – p. 871-875.

39. Khalkhali I. et al. Prone scintimammography in patients with suspicion of carci-noma of the breast // Journal of the American College of Surgeons. – 1994. – Vol.178. – p. 491-497.

40. Khalkhali I et al. Scintimammography: the new role of technetium-99m sestamibi imaging for the diagnosis of breast carcinoma // The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 1997. – Vol. 41. – p. 231-238.

41. Куренков Н.В., Шубин Ю.Н. Радионуклиды в ядерной медицине (получение и использование) ФЭИ-2429, Обнинск. – 1995. – с.3, 20.

42. Ruth T.J., Pate B.D., Robertson R., Porter J.K. Radionuclide Production for Biosciences Review. // Nuclear Medicine and Biology. – 1989. – V.16. – №4. – p. 323-326.

43. Виденский В.Г., Петин В.Г. Рецензия на: Облучение населения США за счет медицинских диагностических процедур. // Медицинская радиология – 1990. – Т. 35. – № 6. – С.50.

44. Беляев С.Т., Васильев А.А., Марченков Н.С., Малинин А.Б. Производство радионуклидов и их использование в медицине (Аналитический обзор). МЦНТИ, М. – 1988. – с.2.

45. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины: учебное пособие для вузов / Г.Е. Кодина, Р.Н. Красикова. – М.: Издательский дом МЭИ, 2014. – 282 с.: ил.

46. Adelstein S.G., Wanning F.G. Isotopes for Medicine and the Life Sciences // Eds Washington, D.C.: National Academy Press. – 1995. – p. 1-4.

47. Кодина Г.Е., Корсунский В.Н. Статус и прогресс использования радиофармпрепаратов технеция-99м в России // Радиохимия. – 1997. – Т. 38. - № 5. – с. 385-388.

48. Методы и технологии получения радиофармпрепаратов: учебное пособие / В.С. Скуридин; Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ). – Томск: Изд-во ТПУ. – 2013. – 139 с.

49. Audi G., Bersillon O., Blachot J., Wapstra A. H. «The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties» // Nuclear Physics. – 2003. – A 729. – p.3–128.

50. Vučina J., Lukić D. Radionuclidic generators for the production of technetium-99m and rhenium-188 // Facta Universitatis. Series: Physics, Chemistry and Technology. – 2002. – Vol. 2. – № 4. – p. 235 – 243.

51. Moore Ph. W. Technetium-99 in Generator Systems // Journal of Nuclear Medicine. – 1984. – №25. – p. 499–502.

52. Skuridin V., Kolvasov A., Chibisov E., Nesterov E. Technetium-99m extraction generator with automatic control // Extended synopses the Third Russian-Japanese Seminar on Technetium. – Dubna, Russia. – 2002. – p.138-139.

53. Machan V. J., Kalincak M., Vilcek S. Sublimation Technetium Generator from PbO + $MoO_3$ Eutectic Mixture // Isotopenpraxis Isotopes in Environmental and Health Studies. – 1981. – Volume 17. – Issue 10. – p. 364-366.

54. Dash Ash., (Russ) Knapp Jr. F.F., Pillai M.R.A. $^{99}$Mo/$^{99m}$Tc separation: An assessment of technology options. // Nuclear Medicine and Biology. – 2013. – Vol. 40. – № 2. – p. 167-176.

55. Хайд Э., Перлман И., Сиборг Г. Ядерные свойства тяжелых элементов. Вып. 1. Трансурановые элементы / Пер. с англ. В. А. Друина и др. – 1967. – 264 с.

56. Bailey R. A., Yaffe L. The separation of some inorganic ions by high-voltage electromigration in paper // Canadian Journal of Chemistry. – 1960. – №38(10). – p.1871-1880.

57. Van J., Smit R. Ammonium salts of the heteropolyacids as cation exchangers // Nature. – May 1958. – №181(4622). – p.1530–1531.

58. Gao J.Z., Sun X.L., Yang W., et. al. Separation and determination of six metal cations by capillary zone electrophoresis // Journal of The Chilean Chemical Society. – 2008. – №53 (1). – p.1420.

59. Eichholz G.G., Nagel A.E., Hughes R.B. Adsorption of ions dilute aqueous solutions on glass and plastic surfaces // Analytical Chemistry. – 1965. – №37 (7). – p.863–868.

60. Брикун И.К., Козловский М.Т., Никитина Л.В. Гидразин и гидроксиламин и их применение в аналитической химии. – Алма-Ата: Наука. – 1967. – 176 с.

61. Голуб А.М., Кёлер Х., Скопенко В.В. Химия псевдогалогенидов. - Киев: Вища школа, 1981. – 360 с.

62. Shuang Liu. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals // Chemical Society Reviews. – 2004. – № 33. – p. 445–461.

63. Лыков А.В. Сублимационная сушка // В кн.: Теория сушки. – М.: Энергия. – 1968. – с. 334 – 362.

64. Эпштейн Н. Б., Скворцов В. Г., Артамонова Л. Д., Радиофармацевтические препараты с Технецием–99m и рением–188 для ядерной медицины // Научная сессия НИЯУ МИФИ. – 2010. – Том I.

65. Лиофилизаты к генератору технеция-99м // Рекламный проспект ООО «Диамед». – М. – 2011. – с. 29.

66. Hammer B.W. A note on the vacuum desiccation of bacteria. // Y. medical research. – 1911. – V. 24.

67. Harris D.L., Shackell L.S. The effect of vacuum desiccation upon the virus of rabies, with remarks upon a new method. // Journal of American Public Health Association. – 1911. – V.l. – p. 52.

68. Филорикъян Д.Ф., Граковская Л.К., Павлова И.А. Некоторые вопросы сублимационной сушки при получении инъекционных препаратов антибиотиков. // Семинар «Применение лиофилизации в фармации». – Рига. – 1986. – с. 22-23.

69. Газзаева А.Д., Осипов С.Н., Антипов А.В., Истранов Л.П. Исследование факторов, влияющих на порообразование в коллагенсодержащих материалах при лиофилизации. // Семинар «Применение лиофилизации в фармации». – Рига. –1986. – С. 45-46.

70. Городецкий И.П., Чернов Н.Е., Кабачный П.И. и др. Изучение условий замораживания и лиофилизации растительных экстрактов с интеразной активностью. // Семинар «Применение лиофилизации в фармации». – Рига. –1986. – с. 44.

71. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.medical-enc.ru/m/11/liofilizacia.shtml свободный. – Загл. с экрана. (дата обращения 12.12.2015 г.).

72. Клочкова Т. И., Исследования по оптимизации производства и стандартизации лиофилизированных препаратов на примере противоопухолевых лекарственных средств: Дисс. доктор фарм. наук/ ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН. – М., 2005. – 200 с.

73. Warburg O. The metabolism of tumours. // Constable. – London. – 1930.

74. Sokoloff L. Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1981. – Vol. I. – No. 1. – p. 7-36.

75. Phelps M.E., Huang S.C., Hoffman E. J., Selin C., Sokoloff L., Kuhl D.E. Tomographic measurement of local cerebral 2-fluoro-2-deoxyglucose: validation of method. // Annals of Neurology. – 1979. – №6. – p.371-388.

76. Студенцов Е.П., Корсаков М.В., Щукин Е.В., Есманский А.А., Мостова М.И Метод синтеза 2-[$^{18}$F]-2-деокси-D-глюкозы: пат. 2165266 Рос. Федерация. №2000116601/14; заявл. 20.06.2000; опубл. 20.04.2001. Бюл. № 11. 21с.

77. Gambhir S.S., Czernin J., Schwimmer J., Silverman D.H., Coleman R.E., Phelps M.E. A tabulated summary of the FDG PET literature. // Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine. – 2001. – V.42. – S.5. – p.1-93.

78. Gondi V, Bradley K, Mehta M, Howard A, Khuntia D, Ritter M, Tomé W., Impact of hybrid fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography on radiotherapy planning in esophageal and non-small-cell lung cancer // International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. – 2007. – V.67(1). – p.187-95.

79. Andrade R.S., Heron D.E., Degirmenci B., Filho P.A., Branstetter B.F., Seethala R.R., Ferris R.L., Avril N. Posttreatment assessment of response using FDG-PET/CT for patients treated with definitive radiation therapy for head and neck cancers // International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. – 2006. – V.65(5). – p.1315.

80. Tralins K.S., Douglas J.G., Stelzer K.J., Mankoff D.A., Silbergeld D.L., Rostomily R.C., Hummel S., Scharnhorst J., Krohn K.A., Spence A.M., Volumetric analysis of $^{18}$F-FDG PET in glioblastoma multiforme: prognostic information and possible role in definition of target volumes in radiation dose escalation. // Journal of Nuclear Medicine. – 2002. – V.43(12). – p.1667.

81. Westerterp M., van Westreenen H.L., Reitsma J.B., Hoekstra O.S., Stoker J., Fockens P., Jager P.L., Van Eck-Smit B.L., Plukker J.T., van Lanschot J.J., Sloof G.W., Esophageal cancer: CT, endoscopic US, and FDG PET for assessment of response to neoadjuvant therapy--systematic review. // Radiology. – 2005. – V.236(3). – p.841.

82. Sakurai H., Suzuki Y., Nonaka T., Ishikawa H., Shioya M., Kiyohara H., Katoh H., Nakayama Y., Hasegawa M., Nakano T., FDG-PET in the detection of recurrence of uterine cervical carcinoma following radiation therapy-tumor volume and FDG uptake value. // Gynecologic Oncology. – 2006. – V.100(3). – p.601.

83. Cascini G.L., Avallone A., Delrio P., Guida C., Tatangelo F., Marone P., Aloj L., De Martinis F., Comella P., Parisi V., Lastoria S. $^{18}$F-FDG PET is an early predictor of pathologic tumor response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. // Journal of Nuclear Medicine. – 2006. – V.47(8). – p.1241.

84. Kasamon Y.L., Jones R.J., Wahl R.L. Integrating PET and PET/CT into the risk-adapted therapy of lymphoma. // Journal of Nuclear Medicine. – 2007. – V.48 (1). – p.19-27.

85. Csaky T.-Z., Wilson J.-E. The fate of 3-O-$^{14}CH_3$-glucose in the rat // Biochim. Biophys. Acta. – 1956. – Vol. 22. – p. 185-186.

86. Kloster G., Muller-Platz C., Laufer P. 3-[11C]-methyl-D-glucose, a potential agent for regional cerebral glucose utilization studies: synthesis, chromatography and tissue distribution in mice // Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. – 1981. – Vol. 18. – p. 855–863.

87. Vyska K., Freundlieb C., Hock A. et al. Analysis of local perfusion rate (LPR) and local glucose transport rate (LGTR) in brain and heart in man by means of

$^{11}$C-methyl-D-glucose (CMG) and dynamic positron emission tomography (dPET). In Radioaktive isotope in klinik und forschung, Hofer R., Bergman H., Ergmann H., (eds) // Gasteiner Internationals. – Vienna. – 1982. – p. 129–142.

88. Feinendegen L-E., Herzog H., Wieler H., Patton D-D., Schmid A. Glucose transport and utilization in the human brain: model using carbon-11 methylglucose and positron emission tomography // Journal of Nuclear Medicine. – 1986. – Vol. 27. – p. 1867–1877.

89. Пат. 2389510 Российская Федерация, МПК A61K49/06, A61K51/04, A61K101/02. Стабилизация радиофармацевтических предшественников [Текст] / Викстром В., Осборн Г., Григг У.; заявитель и патентообладатель Джи-И Хелткер Лимитед (GB), Джи-И Хелткер АС (NO). – № 2007120464/15; заявл. 18.11.05; опубл. 27.01.09. – 2 с.: ил.

90. Wassenaar W., Tator C.-H., Batty H.-P. Glucose analogs aspotential diagnostic tracers for brain tumors // Cancer Research. – 1975. – Vol. 35. – p. 785–790.

91. Charronneau E., Mathieu J.-P., Morin C. Large-scale synthesis and radiolabelling of 6-deoxy-6-iodo-D-glucose (6-DIG) // Applied Radiation and Isotopes. – 1998. – Vol. 49. – p. 1605–1607.

92. Mathieu J.-P., Riche F., Coornaert S., et al. Marquage d’acides gras en position ω par les isotopes de l’iode // Journal of Biophysical Medicine Nuclear. – 1982. – Vol.6. – p. 233–237.

93. Matte G, Adam M, Lyster D. Biological evaluation of 2-fluoro-2-[$^{123}$I]Iodo-mannose (FIM) // Nuclear Medicine and Biology. – 2001. – Vol.28(6). – p. 679-682.

94. Brunet-Desruet M.-D., Ghezzi C., Morin C. et al. Biological Evaluation of Two Iodine-123-Labeled D-Glucose Acetals Prepared as Glucose Transporter // Nuclear Medicine and Biology. – 1998. – Vol.25(5). – p. 473-480.

95. Kloster G., Laufer P., Stöcklin G. D-glucose derivatives labelled with $^{75,77}$Br and $^{123}$I // Nuclear Medicine and Biology. – 1997. – Vol.24(6). - p. 527.

96. Lee H.-K., Moon D.-H., Ryu J.-S., et al. Radioisotope-labeled complexes of glucose derivatives and kits for the preparation thereof // Patent United States Pub. No.: 2003/0120046 A. – 2003.

97. Ozker S.K., Collier B.D., Lindner D.J., Kabasakal L., Liu Y., Krasnow A.Z., Hellman R.S., Edwards S.D., Bourque C.R., Crane P.D. Biodistribution of $^{99m}$Tc-labelled 5-thio-D-glucose. // Nuclear Medicine Communications. – 1999. – V.20(11). – p.1055.

98. Ozker S.K., Collier B.D. Imaging methods and compositions // Patent United States Pub. No.: 06099822A. – 2000.

99. Chen Y., Huang Z.W., He L., Zheng S.L. et al. Synthesis and evaluation of a technetium-99m-labeled diethylentriaminepentaacetate-deoxyglucose complex $^{99m}$Tc-DTPA-DG as a potential imaging modality for tumors // Applied Radiation and Isotopes – 2006. – Vol.64(3). – p. 342-347.

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

101. Cheng D., Rusckowski M., Wang Y.., Liu Y., Liu G., Liu X., Hnatowich D. A Brief Evaluation of Tumor Imaging in Mice with $^{99m}$Tc-glucarate Including a Comparison with $^{18}$F-FDG // Current Radiopharmaceuticals. – 2011. – Vol.4(1). – p. 5-9.

102. Welling M.M., Alberto R. Performance of a $^{99m}$Tc-labelled 1-thio-beta-D-glucose 2,3,4,6-tetra-acetate analogue in the detection of infections and tumours in mice: a comparison with [$^{18}$F]FDG // Nucl. Med. Commun. – 2010. – Vol. 31(3). - P. 239-248.

103. Yang D.J., Kim C.G., Schechter N.R., Azhdarinia A. et al. Imaging with $^{99m}$Tc ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents // Radiology. – 2003. – Vol. 226(2). – p. 465-473.

104. Румшиский Л.З. Математическая обработка результатов эксперимента. – М.: Наука. – 1971. – 192 с.

105. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа: Учеб. Пособие для вузов. – Л.: Химия. – 1984. – 168 с.

106. Veeraragavan K., Rathinasamy P., Ramakrishnan S. Effect of 5-thio-D-glucose on blood glucose and glucose-6-phosphatase activity in mice // Experientia. – 1982. – V.38. – p.910-912.

107. Kelley MJ, Chen TS Effect of 5-thio-D-glucose on hexose transport and metabolism in the mouse small intestine. // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1984. – V.176(2). – p.132-137.

108. Song C.W., Clement J.J., Levitt S.H. Elimination of hypoxic protection by 5-thio-D-glucose in multicell spheroids. // Cancer Research. – 1978. – V.38(12). – p.4499-4503.

109. Schulz R.J., Bongiorni P. The combined effects of oxygen tension, X radiation and 5-thio-D-glucose on the survival of mammalian cells. // International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. – 1982. – V.8(3-4). – p.491-494.

110. Seidensticker, M., Ulrich, G., Muehlberg, F.L., et al. Tumor cell uptake of $^{99m}$Tc-Labeled 1-thio-beta-D-glucose and 5-thio-D-glucose in comparison with 2-deoxy-2-[$^{18}$F]fluoro-D-glucose in vitro: Kinetics, dependencies, blockage and cell compartment of accumulation. // Molecular Imaging and Biology. – 2014. – V.16(2). – p.189-198.

111. Marcelo J. de Oliveira Maia, Tarcísio P. R. de Campos. Synthesis and characterization of radiopharmaceuticals derived of the labeling of the 5-thio-D-glucose. // Book of abstract: International Nuclear Atlantic Conference. – 2007. – №53. – p.1083.

112. Зайцева Л.Л., Величко А.В., Виноградов И.В. Соединения технеция и области их применения. // Итоги науки и техники. М., ВИНИТИ. – 1984. – т. 9. – с.87.

113. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII издание, Т. 1,2,3. – М.:2015. [Электронный ресурс] URL: http://femb.ru/feml (Дата обращения 01.05.2016г.).

114. Вистлер, А.Я. Методы исследования углеводов / А.Я. Хорлин. – М.: Мир, 1975. – 16 с.

115. Иванова И.К., Корякина В.В., Шиц Е.Ю., Федорова А.И. Применение метода $^{13}$С ЯМР спектроскопии для определения термической преобразованности меда // Химия растительного сырья. – 2011. – № 4. – с. 153 – 156.

116. Васильев, А.В. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений / А.В. Васильев, Е.В. Гриненко, А.О. Щукин, Т.Г. Федулина. – СПб: Ленингр. технологич. ин-т, 2007. – 30 с.

117. Lind P., Kumnig G., Matschnig S., Heinisch M., Gallowitsch H.J., Mikosch P., Kresnik E., Gomez I., Unterweger O. The role of F-$^{18}$FDG PET in thyroid cancer. // Acta Medica Austriaca. – 2000. –V.27(2). – p.38-41.

118. Mucha S.A., Kunert-Radek J., Pomorski L. Positron emission tomography ($^{18}$FDG-PET) in the detection of medullary thyroid carcinoma metastases. // Endokrynologia Polska. – 2006. – V.57(4). – p.452.

119. Schlüter B., Bohuslavizki K.H., Beyer W., Plotkin M., Buchert R., Clausen M. Impact of FDG PET on Patients with Differentiated Thyroid Cancer Who Present with Elevated Thyroglobulin and Negative $^{131}$I Scan. // Journal of Nuclear Medicine. – 2001. – Vol. 42. – No. 1. – p.71-76.

120. Foyle T., Jennings L., Mulcahy P. Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation, of method used for sugar analysis of waste paper and straw // Bioresource Technology. – 2007. – V. 98. – №16. – p.3026–3036.

121. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография [Текст] / Ю. Кирхнер.– М: Мир, 1981. – 616 с.

122. Спиваковский В.Б. Аналитическая химия олова. М.: Наука. – 1975. – с. 58-74.

123. Lejeune R., Thunus J., Thunus L. Polarografic determination of (Sn(II) in samples containing Sn (IV) such as in technetium-99m radiopharmaceutical kits. // Analytical Chemistry Acta. – 1996. – V.332. – p.67-71.

124. Доронченкова Т.Н., Харламов В.Т. Стандартизация разбавленных растворов двухвалентного олова для его спектрофотометрического определения. // Химико-фармацевтический Журнал. – 1986. – № 1. – С. 112-116.

125. Европейская фармакопея 7.0, том 1. – Совет Европы. – Страсбург. – 2011/2012. – с. 1812.

126. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. Комиссия по биоэтике. Нормативные документы: Европейская конвенция по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) URL: http://www.msu.ru/bioetika/doc/konv.doc (Дата обращения 21.04.16 г.).

127. Конурбаев Т.Р. влияние метаболизма опухолей на стандартизированный уровень накопления радиофармпрепарата $^{18}$F - ФДГ (SUV) при ПЭТ/КТ исследовании у больных раком пищевода и желудка // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 1.; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=11231 (дата обращения: 06.04.2016).

Приложение А

Акт внедрения результатов диссертационной работы на кафедре Прикладной физики (ПФ) Физико-технического института Томского политехнического университета в учебно-педагогической программе по специальности «Медицинская физика».

TOMSK POLYTECHNIC UNIVERSITY

ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Ministry of Education and Science of the Russian Federation
Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
"National Research Tomsk Polytechnic University" (TPU)
30, Lenin ave., Tomsk, 634050, Russia
Tel. (3822) 60 63 33, (3822) 70 17 79,
Fax (3822) 56 38 65, e-mail: tpu@tpu.ru, tpu.ru
OKPO (National Classification of Enterprises and Organizations): 02069303,
Company Number: 1027000890168,
VAT / KPP (Code of Reason for Registration) 7018007264/701701001, BIC 046902001

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)
Ленина, пр., д. 30, г. Томск, 634050, Россия
тел.: (3822) 60 63 33, (3822) 70 17 79,
факс: (3822) 56 38 65, e-mail: tpu@tpu.ru, tpu.ru
ОКПО 02069303, ОГРН 1027000890168,
ИНН/КПП 7018007264/701701001, БИК 046902001

АКТ

внедрения результатов диссертационной работы Ильиной Е.А. на тему: «Разработка радиофармпрепарата на основе меченной технецием-99m 5-тио-D-глюкозы для медицинской диагностики», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности: 05.17.02 – Технология редких, рассеянных и радиоактивных элементов

Настоящий акт составлен об использовании в учебном процессе результатов и методик экспериментального получения радиофармпрепарата на основе 5-тио-D-глюкозы меченной технецием-99m для медицинской диагностики. Полученные Ильиной Е.А. новые данные о процессе восстановления $^{99m}$Tc в присутствии Sn (II) и процесса присоединения восстановленного радионуклида с субстанцией 5-тио-D-глюкоза характеризует общий методологический подход для получения меченных технецием-99m производных глюкозы.

Результаты исследований используются при чтении курса лекций по теме: «Технология получения радиофармпрепаратов» в соответствии с действующей магистерской программой 010700.24 «Медицинская физика», а также при выполнении практических и лабораторных занятий, включая выполнение курсовых работ.

Начало использования объекта внедрения с 2014 г.

Акт составлен 10 июня 2016 года.

Директор ФТИ ТПУ О.Ю. Долматов

Заведующий кафедрой ПФ ФТИ ТПУ А.Р. Вагнер

# Приложение Б

## Акт внедрения результатов диссертационной работы в производство лиофилизатов в Томском Научно-исследовательском институте Онкологии

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
**«Томский научно-исследовательский институт онкологии»**
**(Томский НИИ онкологии)**
Кооперативный пер., д.5, Томск, 634009
Тел./ факс (3822) 51 10 39, 51 40 97
E-mail: clinica@oncology.tomsk.ru
ОКПО 01895186, ОГРН 1027000861568,
ИНН/КПП 7019011979/701701001

УТВЕРЖДАЮ
Директор Томского НИИ онкологии,
академик РАН
_____/Чойнзонов Е.Л.
«____»_____2016 г.

АКТ

Внедрения в производство результатов диссертационной работы Ильиной Е.А. на тему: «Разработка радиофармпрепарата на основе меченной технецием-99м 5-тио-D-глюкозы для медицинской диагностики», представленной на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности: 05.17.02 – Технология редких, рассеянных и радиоактивных элементов.

Настоящий акт составлен комиссией:

Председатель комиссии:

Заместитель директора по научной работе
и инновационной деятельности, д.м.н., проф. Чернов В.И.

Члены комиссии:

Старший научный сотрудник, к.м.н. Синилкин И.Г.

Врач-радиолог, к.м.н. Зельчан Р.В.

Методика получения и состав меченного технецием-99м препарата на основе 5-тио-D-глюкозы, разработанные в процессе выполнения диссертационный исследований, используются для приготовления лиофилизатов того же состава при синтезе нового отечественного радиофармацевтического препарата «5-тио-D-глюкозы,$^{99m}$Tc». Доклинические испытания препарата проводятся в Томском НИИ онкологии в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» по теме «Разработка методов получения моносахаридов меченых технецием-99м для диагностики злокачественных новообразований». Одним из важнейших результатов внедрения считаем создание стабильного радиофармпрепарата на основе 5-тио-D-глюкозы с уровнем накопления в сочетании с его высоким выходом меченного продукта и радиохимической чистотой. Все это делает препарат конкурентоспособным по сравнению с зарубежными аналогами. В Российской Федерации подобные препараты отсутствуют.

Начало использования объекта внедрения с 2013 г.

Председатель комиссии: Чернов В.И.

Члены комиссии: Синилкин И.Г.

Зельчан Р.В.