

РАЗРАБОТКА МЕЧЕННОГО РАДИОНУКЛИДОМ ^{177}Lu БИОКОНЪЮГАТА, АНТАГОНИСТА ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ-ГОРМОНА

А.Н. Гурин¹, Е.Т. Чакрова¹, И.В. Матвеева^{1,2}, П. Русс³

¹ Научно-технический центр радиохимии и изотопного производства, Республиканское государственное предприятие Институт ядерной физики, Алматы, Казахстан

² Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, факультет химии и химической технологии, Алматы, Казахстан

³ Университет Осло, Химический факультет, Осло, Норвегия

Разработка радиофармацевтических препаратов является длительным и сложным процессом, который должен отвечать требованиям надлежащей производственной практики, фармакопеи и радиационной безопасности. В настоящей работе представлены результаты поэтапной разработки меченного лютецием-177 непептидного антагониста гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) элаголикс (ELA). Лютеций-177 был получен по реакции (n, γ) из мишени LuCl_3 на реакторе ВВР-К. Мечение проводилось полуавтоматическим способом.

Ключевые слова: радиофармпрепарат, лютеций-177, мечение, радионуклидная терапия, трижды-негативный рак молочной железы

Введение

Лечение рака молочной железы может быть выполнено с использованием одного или комбинации следующих методов: гормональная терапия, хирургическое вмешательство, химиотерапия и лучевая терапия. Побочные эффекты ограничивают эффективность химиотерапии / радионуклидной терапии, но их можно избежать если используемые препараты обладают селективностью [1–4]. Требуемая селективность адресной терапии может быть достигнута путем разработки радиофармацевтических препаратов.

Трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) характеризуется более агрессивным течением среди всех типов РМЖ, макси-

мальным риском рецидива в течение первых трех лет после хирургического лечения, а также метастазированием и снижением продолжительности жизни, отсутствием экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона и эпидермального фактора роста типа 2 (HER-2) [5, 6]. До недавнего времени считалось, что клетки ТНРМЖ не имеют или имеют очень мало рецепторов на своей поверхности. Однако было обнаружено, что гонадотропин-рилизинг-гормон (ГнРГ) более чем в 50 % случаев экспрессируется рецепторами клеток ТНРМЖ [7]. В свою очередь, использование аналогов ГнРГ позволит осуществлять транспортировку радионуклида до клеток новообразования и проводить адресную радионуклидную терапию.

Механизм действия агонистов ГнРГ включает две фазы: кратковременную фазу стимуляции и фазу десенситизации гипофиза, когда гонадотрофы остаются резистентными к стимуляции и уровень гонадотропинов в крови снижается. Механизм действия антагонистов ГнРГ противоположен действию агонистов. После введения антагонистов-ГнРГ они конкурентно блокируют рецепторы ГнРГ в гипофизе. В отличие от агонистов ГнРГ, антагонисты действуют немедленно и прочно связываются с рецептором ГнРГ, не вызывая его активации [8]. Воздействие на клетки ГнРМЖ дополнительно β -излучением позволит достичь двойного терапевтического эффекта.

Разработка нового радиофармпрепарата включает следующие этапы: выбор активного вещества, выбор радиоизотопа, систем подвижных фаз для хроматографических исследований, определение оптимальных параметров мечения, очистка, приготовление изотонической формы препарата пригодной для исследований *in vivo* и *in vitro*.

Материал и методы

Радионуклид ^{177}Lu получали из оксида лютеция (82,0 %, ^{176}Lu). Активная субстанция была синтезирована в университете Осло (Норвегия). Все используемые химические реагенты и растворители соответствовали классу ХЧ (химически чистые). Чистота радионуклида ^{177}Lu была определена с помощью гамма-спектрометрии с германиевым детектором высокой чистоты (Ortec). Источник ^{152}Eu (ОСГИ) использовался для калибровки детектора по энергии и эффективности. Также были использованы: радиохроматограмм-сканер Veenstra VCS-103 (Нидерланды); хроматографическая бумага типа FN1 (Filtrak, Германия); ионизационная камера NaI (Tl) для измерения общей радиоактивности (Capintec, Inc., USA). Для анализа методом ВЭЖХ использовали систему фирмы Shimadzu (Shimadzu, Япония), оснащенную колонкой Shim-pack VP-ODS с обращенной фазой C18 (5 мкм, 4,6×250). ВЭЖХ проводили с использованием насосной системы Shimadzu LC-10ADvp в сочетании с УФ- (Shimadzu SPD-10Avp) и радиометрическим (Bioscan Inc., США) детекторами.

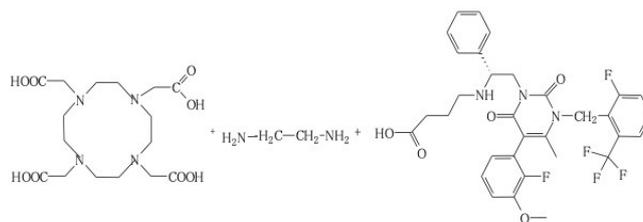


Рис. 1. Схема синтеза DOTAELA

Активное вещество

Среди аналогов ГнРГ особое внимание занимают непептидные антагонисты. Особый интерес объясняется тем, что данные соединения имеют меньшую молекулярную массу по сравнению с агонистами и пептидными антагонистами ГнРГ, что в свою очередь влияет на транспортировку вещества к клеткам и клиренс вещества в организме. На этом основании был выбран антагонист-аналог гонадотропин-рилизинг-гормона, элаголикс.

Разработка радиофармацевтических препаратов, полученных с использованием радио-металлов для радиоактивной метки, является длительным и сложным процессом. Существует много требований, предъявляемых к радиофармацевтическим препаратам для терапии и диагностики. Радиофармацевтические препараты должны иметь высокую радиохимическую чистоту и обеспечивать высокую терапевтическую дозу, и синтез предпочтительно должен быть простым и не должен занимать много времени. Исходя из представленного анализа для разработки радиофармпрепарата были выбраны следующие компоненты: элаголикс, хелатирующий агент ДОТА и этилендиамин в качестве линкера. Молекула (далее DOTAELA) была синтезирована (рис. 1) в университете Осло, Норвегия.

Высокая кинетическая инертность комплекса, т.е. медленная скорость диссоциации ДОТА, обеспечивает стабильность связи с радионуклидом, однако из-за медленной скорости ассоциации для введения метки требуются повышенная температура.

Выбор радионуклида определяется такими факторами, как тип распада, период полураспада, энергия излучения (т.е. величина пробега частиц в ткани), удельная активность, природная распространенность материнского нуклида, радиохимическая чистота. Учитывается и склонность выбранного изотопа отделяться *in vivo* от молекулы-носителя. Материнский изотоп, из которого получают радионук-

лид, должен быть стабильным, а дочерний – сравнительно короткоживущим [9, 10].

Лютеций-177 с периодом полураспада ($T_{1/2}$) 6,89 сут одновременно излучает β -частицы со средней энергией 149 и 475 кэВ, и γ -кванты с энергией 113 и 208 кэВ. Учитывая, что ^{177}Lu одновременно испускает β -частицы (глубина проникновения в ткани около 2 мм), пригодные для медицинского лечения, и γ -кванты, пригодные для получения изображения, он определяется как идеальный радионуклид, с помощью которого одновременно могут быть осуществлены как лечение, так и получение изображения [11, 12].

Выбор систем подвижных фаз для хроматографических исследований

Хроматографическая система разрабатывалась для субстанции DOTAELA, меченной изотопом лютеция-177. Лютеций-177 получали путем облучения 400 мкг обогащенного по лютецию-176 хлорида потоком тепловых нейтронов $2 \cdot 10^{14}$ н/см²·с в течение 291 ч. После облучения мишень выдерживали 6 ч, после чего в горячей камере при помощи установки для вскрытия ампул проводили растворение мишени в 2 мл 0,01 М раствора соляной кислоты.

Для радиомечения DOTAELA во флакон на 10 мл отбирали 71 мкл раствора DOTAELA, так чтобы конечная концентрация была 30 мкг/мл, затем добавляли 125 мкл ацетатного буферного раствора с pH 4,5, после чего прибавляли 8 мкл хлорида лютеция-177 и доводили объем до 2 мл. Полученную смесь помещали в глицириновую баню при 80–90°C на 30 мин. По окончании времени флакон извлекали и остужали.

В качестве неподвижной фазы использовали хроматографическую бумагу типа FN1 и Ватман № 3 общей длиной при использовании восходящего метода 15 см. На линию старта наносили 5 мкл испытуемого раствора на расстоянии 1,5 см от начала хроматографической полоски; после нанесения пятно высушивали. В качестве подвижных фаз использовали: 10 % раствор ацетата аммония в метаноле (30:70 об./об.); раствор хлорида натрия 0,9 %; 0,1 М буферный раствор цитрата натрия, pH 5,0.

Для получения хроматограмм полоски помещали поочередно в системы с различными подвижными фазами. После хроматографиро-

вания в органической среде анализ хроматограмм показал, что не прореагировавший Lu-177 остается на линии старта и не перемещается вместе с фронтом растворителя, а субстанция ^{177}Lu -DOTAELA, наоборот, перемещается с фронтом растворителя, и не имеет четкого характера пика. Поэтому данная система не подходит для разделения. После применения в качестве подвижных фаз водных растворов цитрата натрия и хлорида натрия пик, соответствующий ^{177}Lu -DOTAELA, располагался на линии старта, а пик, соответствующий свободному Lu-177, перемещался по хроматограмме вместе с фронтом растворителя. Отсюда следует важный вывод, что ^{177}Lu -DOTAELA не препятствует определению не прореагировавшего Lu-177. Для контроля местоположения на хроматограмме не прореагировавшего Lu-177 параллельно хроматографировали исходный раствор лютеция-177.

Таким образом, было установлено, что наилучшими параметрами для изучения поведения ^{177}Lu -DOTAELA и получения хроматограмм продуктов ее взаимодействия с ^{177}Lu обладает цитратный буферный раствор (рис. 2) [13].

Результаты, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), согласуются с результатами, получен-

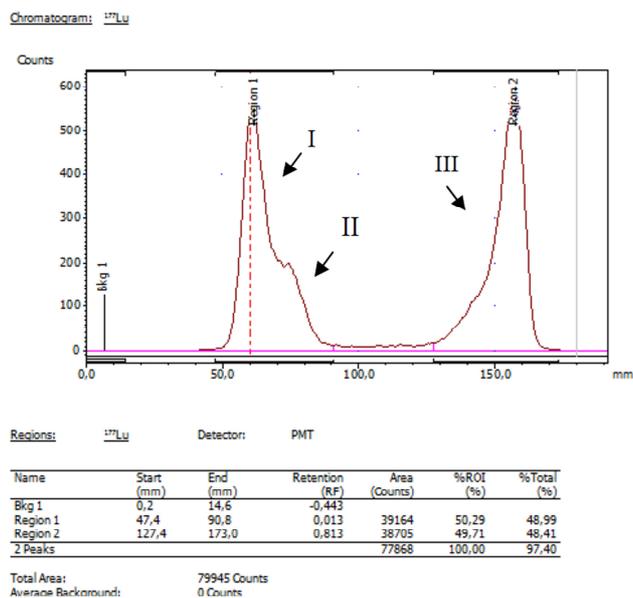


Рис. 2. Хроматограмма ^{177}Lu -DOTAELA. Пики (I): ^{177}Lu -DOTAELA, (II): ^{177}Lu , (III): фрагменты радиолиты ^{177}Lu -DOTAELA [13]

Таблица 1

Определение оптимальных параметров мечения

№	pH	Время, мин	Температура, °C	Выход, %
1	2,0	30	60	21,3 ± 0,5
2	4,5	30	60	50,1 ± 0,3
3	6,0	30	60	46,3 ± 0,7
4	4,5	5	60	24,7 ± 0,7
5	4,5	30	60	50,1 ± 0,9
6	4,5	60	60	49,4 ± 0,8
7	4,5	40	25	5,1 ± 0,9
8	4,5	40	40	20,3 ± 0,3
9	4,5	40	60	51,2 ± 0,9
10	4,5	40	80	76,8 ± 1,1
11	4,5	40	90	95,9 ± 1,3
12	4,5	40	100	96,9 ± 1,1

ными методом бумажной хроматографии. Однако захват ионов ^{177}Lu в обратной фазе колонки не обеспечивает необходимой надежности анализа радиохимического выхода; поэтому в данном случае предпочтительным является использование метода бумажной хроматографии, который дает представление о содержании радиохимических форм ^{177}Lu .

Экспериментальная часть

Определение оптимальных параметров мечения

Исследования по определению оптимальных параметров процесса получения комплекса ^{177}Lu -DOTAELA, проводились в направлении изучения влияния таких параметров, как время комплексообразования, pH и температура. Общий объем составлял 2 мл, количество DOTAELA были постоянным (табл. 1).

После анализа полученных данных была разработана технологическая схема и был произведен контрольный синтез радиомечения DOTAELA. Во флакон на 10 мл отбирали 100 мкл раствора DOTAELA с концентрацией раствора 1 мг/мл, затем добавляли 125 мкл ацетатного буферного раствора с pH 4,5, после чего прибавляли 50 мкл хлорида лютеция-177 и доводили объем до 2 мл дистиллированной водой. Конечную смесь устанавливали в глицериновую баню при 90–95°C на 40 мин. Согласно этой схеме, радиохимический выход составил $\geq 95\%$ (рис. 3).

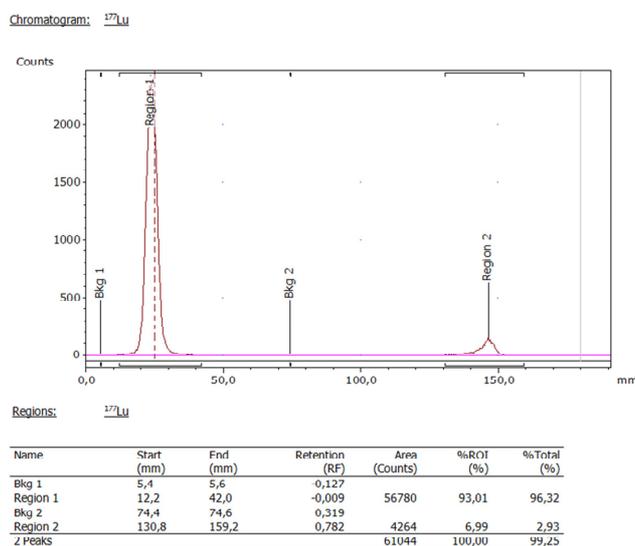


Рис. 3. Хроматограмма, полученная на основе оптимальных параметров

Исследование процесса очистки комплекса

Одной из важнейших проблем синтеза радиофармпрепаратов является очистка от примесей, снижающих радиохимическую чистоту (РХЧ). Примесями являются остатки исходных реагентов, продукты побочных реакций. Выбираемые методы очистки меченых соединений зависят от химических свойств соединений, радиоактивных побочных продуктов и химических примесей. Наличие радиохимических примесей в радиофармацевтическом

препарате обуславливает излишнюю лучевую нагрузку на пациента и нежелательно высокий тканевой фон радиоактивности, который уменьшает контраст изображения или терапевтическую эффективность. Поэтому, если процесс радиомечения приводит к неудовлетворительной радиохимической чистоте, то стадия очистки является неизбежной.

В настоящей работе в качестве метода очистки полученного комплекса после радиосинтеза была выбрана твердофазная экстракция. Очистка с помощью твердофазной экстракции с картриджа происходит, когда картридж удерживает большую часть продукта, а примеси свободно покидают колонку или наоборот.

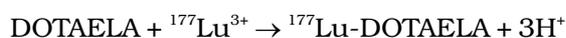
Процесс очистки состоял из трех стадий: адсорбции, промывки и элюирования. Согласно полученным данным в экспериментах, на картриджах с C18 и с наполнением различными катионитами (SCX, Dowex 50W-X-12, Purolite WCA 100, KV-2) происходит задерживание катиона $^{177}\text{Lu}^{3+}$, а также удержание комплекса ^{177}Lu -DOTAELA. В случае с картриджем C18 полученные результаты согласуются с теорией, однако в случае с катионитами происходит не удержание, а разрушение комплекса, в связи с чем применение катионитов сводится к поиску более слабых соединений. Для промывки картриджа с C18 использовали дистиллированную воду и ацетатный буферный раствор с pH-5,0. В обоих случаях в результате промывки свободный $^{177}\text{Lu}^{3+}$ удаляется с картриджа, а комплекс оставался. Последовательное элюирование комплекса с картриджа C18 после промывки этанолом и ацетонитрилом не дало удовлетворительных результатов. Объем элюентов составлял от 5 мл до 100 мл, с выходом комплекса от 10–15 %. Более подробно результаты процесса очистки отражены в работе [14].

На основании этих результатов можно сделать вывод, что стандартная реализация очистки C18, которая обычно эффективна для устранения не включенных ионов $^{177}\text{Lu}^{3+}$, нуждается в применении веществ, понижающих эффект радиолитического распада, к примеру аскорбиновой кислоты, для поддержания РХЧ ^{177}Lu -DOTAELA, а также в поиске других элюентов. Например, использование трифторуксусной кислоты для увеличения полярности растворителя.

Получение изотонического раствора

Введение растворов для инъекций, осмотическое давление которых отличается от осмотического давления кровяной плазмы, вызывает резкую боль, ощущение которой тем сильнее, чем больше осмотическая разница. Возможность устранения ощущения резкой боли при использовании инъекционных растворов реализуется путем введения вспомогательных веществ для изотонирования раствора.

В настоящей работе исходные компоненты брали в соотношении 1:1 согласно уравнению химической реакции. К 200 мкл раствора DOTAELA добавляли 125 мкл ацетатного буферного раствора с pH 4,5, после чего прибавляли хлорид лютеция-177, растворенный в 0,01 М хлороводородной кислоте. Общий объем доводится водой для инъекций до 2 мл.



Конечный продукт содержит:

- ✓ комплекс ^{177}Lu -DOTAELA – 232,8 мкг;
- ✓ натрия ацетат – 0,0079 г.

Осмотическое давление многокомпонентного раствора по закону Дальтона [15, 16] складывается из парциальных осмотических давлений P_n отдельных компонентов:

$$P = P_1 + P_2 + P_3 + \dots \quad \text{и т.д.} \quad (1)$$

На долю каждого из компонентов приходится изотонирование соответствующего объема V раствора в миллилитрах:

$$V_{\text{общ}} = v_1 + v_2 + v_3, \quad \text{откуда } v_3 = V_{\text{общ}} - (v_1 + v_2), \quad (2)$$

$$V_1 = (1000 m_1 i_1) / 0,29 \text{ М.} \quad (3)$$

Концентрация комплекса ^{177}Lu -DOTAELA и хлороводородной кислоты таковы, что практически не влияют на величину осмотического давления. Выполним расчеты для натрия ацетата:

$$V(\text{CH}_3\text{COONa}) = (1000 \cdot 0,0079 \cdot 1,86) / (0,29 \cdot 71) = 0,71 \text{ мл.}$$

$$V(\text{NaCl}) = V_{\text{общ}} - V(\text{CH}_3\text{COONa}) = 2 - 0,71 = 1,29 \text{ мл.}$$

Рассчитываем массу натрия хлорида для изотонирования раствора:

$$m(\text{NaCl}) = (0,29 \cdot 58,5 \cdot 1,29) / (1000 \cdot 1,86) = 0,012 \text{ г.}$$

Заключение

В результате разработки меченного ^{177}Lu биоконъюгата DOTAELA как предполагаемого перспективного радиофармпрепарата, была

подобрана цитратно-буферная система с $pH=5.0$ для определения радиохимической чистоты методом бумажной хроматографии. Определены оптимальные параметры радиомечения: pH синтеза ^{177}Lu -DOTAELA 4,5, температура $90\text{--}100^\circ\text{C}$, время комплексообразования 40 мин. В результате исследований разработана технологическая схема получения комплекса ^{177}Lu -DOTAELA. Согласно этой схеме, радиохимический выход составляет $\geq 95\%$. Полученный раствор доводится до изотонической формы препарата и пригоден для изучения интернализации и экспрессии клеток ТНРМЖ.

Благодарность

Авторы искренне благодарны за поддержку, оказанную Университетом Осло, г. Осло, Норвегия.

Эта работа была поддержана Министерством образования и науки Республики Казахстан [№ AP05134384, 2018].

Список литературы

- Ma H., Xu X., Clague J. et al. Recreational physical activity and risk of triple negative breast cancer in the California Teachers Study // *Breast Cancer Res.* 2016. Vol. 18. № 1. P. 1–16.
- Friedenreich C.M., Cust A.E. Physical activity and breast cancer risk: Impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects // *Br. J. Sports Med.* 2008. Vol. 42. № 8. P. 636–647.
- Ma H., Luo J., Press M.F. et al. Is there a difference in the association between percent mammographic density and subtypes of breast cancer? // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009. Vol. 18. № 2. P. 479–485.
- Anders C.K., Carey L.A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer // *Clin. Breast Cancer.* Elsevier Ltd., 2009. Vol. 9. Suppl. 2. P. S73–S81.
- Feig S.A. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors // *Breast Dis.* 2006. Vol. 16. № 4. P. 337–338.
- Mehta R.S. Dose-dense and/or metronomic schedules of specific chemotherapies consolidate the chemosensitivity of triple-negative breast cancer: A step toward reversing triple-negative paradox // *J. Clin. Oncol.* 2008. Vol. 26. № 19. P. 3286–3288.
- Kwok C.W. et al. Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) as therapeutic targets in triple negative breast cancers (TNBC) // *Target. Oncol.* 2015. Vol. 10. № 3. P. 365–373.
- Taylor J.E. Miller B.T., Gray K.D. et al. The mechanism responsible for the supraphysiologic gonadotropin surge in females treated with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and primed with GnRH antagonist // *Fertil. Steril.* 2010. Vol. 93. № 5. P. 1668–1675.
- Бекман И. Н. Ядерная медицина: физические и химические основы 2-е изд., испр. и доп. Учебник для бакалавриата и магистратуры. – М.: ЮРАЙТ. 2017. 400 с.
- Бекман И.Н. Радиационная и ядерная медицина: физические и химические аспекты. Радиохимия. Том 7. Учебное пособие – МО: Щёлково: Издатель Мархотин П.Ю. 2012. 400 с.
- Siwowska K., Guzik P., Domnanich K.A. et al. Therapeutic Potential of ^{47}Sc in Comparison to ^{177}Lu and ^{90}Y // *Preclinical Investigations Pharmaceutics.* 2019. № 11(424). P. 1–14.
- Banerjee S., Pillai M.R., Knapp F.F. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: Linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. // *Chem. Rev.* 2015. Vol. 115. P. 2934–2974.
- Gurin A.N., Soloninkina S.G., Riss P. et al. Selection of mobile phase systems for chromatographic research of ^{177}Lu -DOTAELA // *Chem. J. Kazakhstan.* 2018. № 2. P. 151–157.
- Gurin A.N., Riss P., Chakrova Ye.T. et al. Study of the purification of ^{177}Lu -dotaela complex // *Pharm. Chem. J.* 2020. Vol. 54. № 1. P. 24–28.
- <https://www.khanacademy.org/science/chemistry/gases-and-kinetic-molecular-theory/ideal-gas-laws/a/daltons-law-of-partial-pressure>.
- Горшков В.И., Кузнецов И.А. Основы физической химии. – М.: Бином, 2006. 408 с.

**DEVELOPMENT OF ^{177}Lu -LABELED RADIONUCLIDE BIO-CONJUGATE,
ANGONOTROPIN-RELEASING-HORMONE ANTAGONIST**

A.N. Gurin¹, Ye.T. Chakrova¹, I.V. Matveeva^{1,2}, P. Riss³

¹ *Scientific and Technical Center of Radiochemistry and Isotope Production; Institute of Nuclear Physics, Almaty, Kazakhstan*

² *Al-Farabi Kazakh National University, Department of Chemistry and Chemical Technology, Almaty, Kazakhstan*

³ *University of Oslo, Department of Chemistry, Oslo, Norway*

The development of radiopharmaceuticals is a long and complex process that must meet the requirements of good manufacturing practice, pharmacopeia and radiation safety. This paper presents the results of the phased development of a Lu-177 labeled nonpeptide antagonist of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) elagolix (ELA). Lutetium-177 was obtained by the reaction (n, γ) from a LuCl_3 target in a WWR – K reactor. Labeling was carried out in a semi-automatic way.

Key words: *radiopharmaceutical, lutetium-177, labeling, radionuclide therapy, thriple-negative breast cancer*

E-mail: gurin.andrey@inp.kz