

# Синтез фармацевтической композиции PSMA-11 и радиоактивного фармацевтического препарата [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11, меченный <sup>99m</sup>Tc

Усаров З.О., Абдукаюмов А.М., Рихсиев А.З., Хажиев Л.О.

Государственное предприятие «РАДИОПРЕПАРАТ» ИЯФ АН РУз, Узбекистан, Ташкент

zafar.usarov@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия среди мужчин наиболее распространенным злокачественным новообразованием является рак предстательной железы, что в среднем составляет 20% от всех случаев злокачественных новообразований [1]. В связи с этим позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с прицельно нацеленным простат-специфическим мембранного антигена (ПСМА) стала существенной частью визуализации рака предстательной железы (РПЖ). По данным [2] в некоторых национальных руководствах этот метод является предпочтительным для обнаружения поражения при биохимическом рецидиве (БХР) после первичного лечения и является обязательным перед радионуклидной терапией с использованием ПСМА. Однако во многих странах доступ больных нуждающимся к ПЭТ исследованиям часто ограничен, либо из-за высокой стоимости процедур метода ПЭТ, либо из-за ограничения доступности ядерных центров. В связи с этим, одним из важных клинических проблем современной медицины, является раннее выявление и визуализация рецидивов после простатэктомии, первичного и метастатического рака предстательной железы, что впоследствии поможет своевременному принятию решений точной целевой терапии этой болезни. Для этой цели в данное время в клинических условиях используется дорогой метод диагностики ПЭТ/КТ с применением <sup>68</sup>Ga-HBED-CC-PSMA (PSMA-11), который недоступен основной категории населения. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что ингибитор PSMA меченный <sup>99m</sup>Tc позволяющий сканированию методом ОФЭКТ [<sup>99m</sup>Tc]-MIP1404 обнаруживают ПСМА-положительные поражения с высокой чувствительностью у больных с биохимическим рецидивом РПЖ (70 и 77% обследованных соответственно) [3-4].

Таким образом, исходя из экономических соображений, требуется разработка технологии получения радиофармацевтического препарата на основе пептида-лиганда PSMA-11, меченного радионуклидом <sup>99m</sup>Tc, позволяющей регистрировать на ОФЭКТ/КТ для обеспечения недорогостоящей медицинской поддержки всех слоев населения, особенно нуждающимся социальной защите пациентов.

Настоящая работа посвящается исследованию синтеза фармацевтической композиции (ФК) с пептидом-лигандом PSMA-11, оптимизацией количества пептида-лиганда PSMA-11, восстанавливающего агента, пертехнетата натрия (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) из Генератора <sup>99m</sup>Tc и pH реакционной смеси для получения [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 с максимально возможным радиохимическим выходом (РВ) и радиохимической чистотой (РХЧ).

Синтезированный радиофармацевтический препарат [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 в последствие используется как диагностическое средство ОФЭКТ-КТ положительных по антигену ПСМА у мужчин при раке предстательной железы, с подозрением на метастазы, с подозрением на рецидив на основании повышенного уровня простат-специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови человека.

## Экспериментальная часть. Материалы.

Все реактивы и лабораторные реагенты растворители, использованные в работе, были высшей степени чистоты (если не указано иное). Пептид-лиганд PSMA-11 приобретен у MedChemExpress. Дигидрат хлорида двухвалентного олова закуплен у Sigma Aldrich.

## Оборудование

Все радиометрические измерения проводились на четырехканальном гамма-спектрометре NP-424L (Венгрия) и Ludlum 2200 (США). Измерения количественных и качественных активностей радионуклидов проводились на гамма спектрометрическом устройстве АСПЕКТ СУ-03П с полупроводниковым Ge(Li) детектором. Идентификацию радионуклидов провели по их гамма-линиям. Для измерения и корректировки pH растворов использовали pH-метр Mettler Toledo Seven Easy (Швейцария). Фильтрация растворов осуществлялась с помощью мембранных фильтров с размером пор 0,22 мкм производства Millipore Express (PES). Лиофилизация растворов реагента набора лиофилизата PSMA-11 осуществляли в установке для лиофильной сушки «Epsilon 2-16D».

Процесс мечения пептида-лиганда ПСМА-11 техницием-99m проводили в водяной термостат-бане STEGLER WB-4. Пертехнетат натрия (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) получали из Генератора <sup>99m</sup>Tc производства ГП «Радиофармацевт». Радиохимическая чистота (РЧ) и радиохимический выход мечения (РВ) оценивали методами тонкослойной хроматографии (ТСХ). В качестве неподвижной фазы (НФ) использовали «TLC Kieselgel 60».

## Результаты и обсуждения

### Синтез партий фармацевтической композиции (ФК) [PSMA-11]

Для синтеза раствора реагента ФК [PSMA-11] водный раствор пептида-лиганда PSMA-11 вводили последовательно раствор аскорбатного буферного раствора с pH 5, виннокислого натрия и L-цистеина. После полного растворения всех ингредиентов вели солянокислый раствор двухвалентного олова. Содержание SnCl<sub>2</sub> в реакционной смеси составляла 40 мкг/мл. Процесс синтеза раствора реагента фармацевтической композиции осуществляли пропуская через раствор реакционной смеси инертного газа. Затем раствор фармацевтической композиции пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм, расфасовывали во флаконы для лекарственных средств и замораживали при температуре -50 °C с последующей лиофилизацией. Для получения радиофармацевтического препарата [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 лиофилизат ФК [PSMA-11] растворяли в растворе пертехнетата натрия из Генератора, Tc-99m активностью 37-2500 МБк, после чего инкубировали на водяной термостат-бане при температуре 90 °C в течение 20 минут. В результате получали радиофармацевтический препарат [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 с радиохимическим выходом и радиохимической чистотой более 98,5±0,5% n=6.

### Определение радиохимического выхода процесса мечения лиофилизата ФК [PSMA-11] с раствором Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> из «Генератора <sup>99m</sup>Tc».

Определение радиохимического выхода процесса мечения лиофилизата ФК [PSMA-11] осуществляли определением РХЧ радиофармпрепарата [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 методом ТСХ. Пластинку с тонким слоем силикагеля (ТСХ) разрезали полоски размером 10x100 мм, на линию старта наносили пробу исследуемого раствора объемом 1,0-1,5 мкл и высушивали на воздухе. Затем пластины переносили в камеру для ТСХ хроматографировали восходящим методом в течение 20 минут до достижения подвижной фазы линии финиша используя в качестве подвижной фазы смесь ацетонитрила с этиловым спиртом (CH<sub>3</sub>CN:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) в соотношении фаз 9:1. Полученные полоски высушивали, обклеивали ее с двух сторон липкой полиэтиленовой лентой, разрезали на части по 1 см и измеряли скорость счета от участка, содержащего комплекс [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11, и от всей хроматограммы (сумма счета импульсов хроматограммы (сcc) радиометрическим методом).

Результаты исследований определения радиохимической примеси (РХП) радиофармпрепарата [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 приведены на рисунках -1 и 2. В указанном режиме хроматографирования Фактор удерживания (R<sub>f</sub>) комплекса [<sup>99m</sup>Tc]-ПСМА-11 и коллоидов <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> составляет (0,2 ± 0,1), а R<sub>f</sub> ионов пертехнетата, (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) – 0,9-1,0.

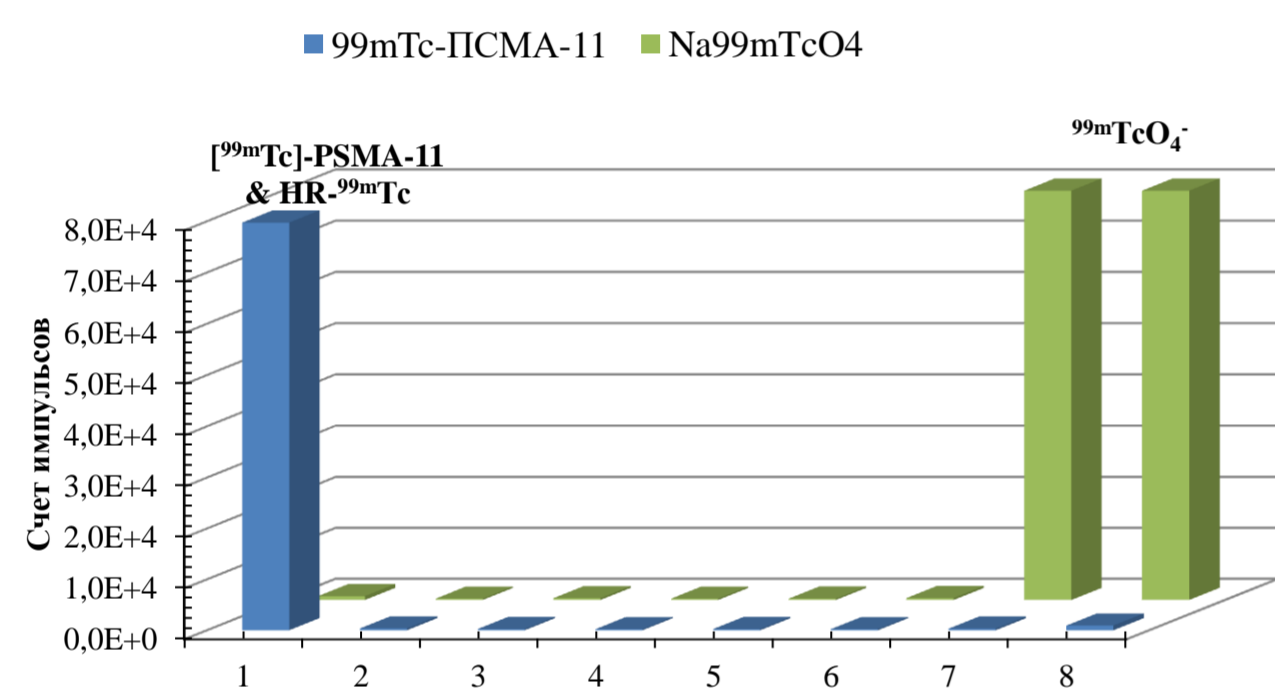


Рисунок 1. Распределение радиофармпрепарата [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 на ТСХ «TLC Kieselgel 60», ПФ-CH<sub>3</sub>CN:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, n=3;

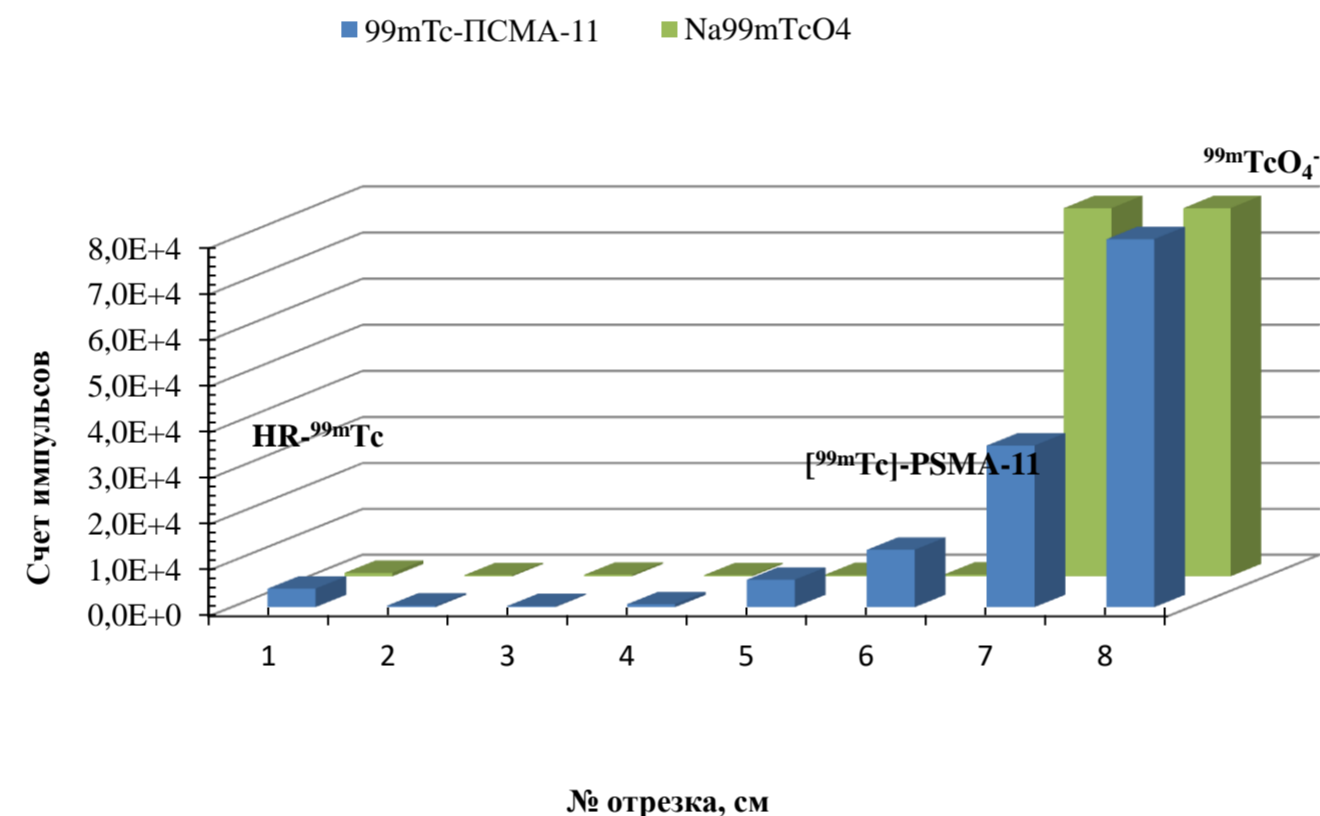


Рисунок 2. Распределение радиофармпрепарата [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 на ТСХ «TLC Kieselgel 60», ПФ 1M CH<sub>3</sub>COONa:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, n=3

Процентное содержание примеси ионов пертехнетата определяли с помощью подсчета на полосках проявленной в смеси растворителей ацетонитрила с этиловым спиртом в соотношении фаз 9:1 следующим образом:

$${}^{99m}\text{TcO}_4^- = \frac{\sum \text{сcc}({}^{99m}\text{TcO}_4^- + [{}^{99m}\text{Tc}]\text{-PSMA-11})}{\sum \text{сcc}({}^{99m}\text{TcO}_4^-)} \times 100\% \quad (1)$$

Определение количества доли гидролизованно-восстановленного <sup>99m</sup>Tc (HR-<sup>99m</sup>Tc) в РФП осуществляли также ТСХ только в качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей 1,0M раствор ацетата аммония и метанол в соотношении фаз 1:1 по объему.

Процедуру проводили трижды для каждого измерения. Фактор удерживания (R<sub>f</sub>) гидролизованно-восстановленного <sup>99m</sup>Tc (HR-<sup>99m</sup>Tc) составляла R<sub>f</sub>=0,2, а фактор удерживания [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 R<sub>f</sub>=0,8.

Процентное содержание гидролизованно-восстановленного <sup>99m</sup>Tc (HR-<sup>99m</sup>Tc) определяли с помощью подсчета на полосках проявленной в 1M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>:C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH с соотношением фаз по объему 1:1:

$$\text{HR}^{99m}\text{Tc} = \frac{\text{HR}^{99m}\text{Tc}}{\sum \text{сcc}} \times 100\% \quad (2) \quad \text{РХЧ} = 100\% - ({}^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{HR}^{99m}\text{TcO}_4^-) \quad (3)$$

При определении радиохимической примеси РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 для определения подвижности ионов <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> на ТСХ с различными проявителями, параллельно с РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 на отдельные ТСХ нанесли из раствора пертехнетата натрия и идентично хроматографировали.

Полученные результаты измерений радиохимической чистоты синтезированного РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 показали, что радиохимический выход мечения составляла более 98,5±0,5% при n=6.

Результаты синтеза лиофилизата ФК [PSMA-11] и РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 с различным количеством пептидом-лигандом PSMA-11 и аскорбиновой кислоты (АСК) приведены на рисунках 3 и 4. Процесс мечения проводили введением Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> с активностью 1,85 ГБк из генератора <sup>99m</sup>Tc.

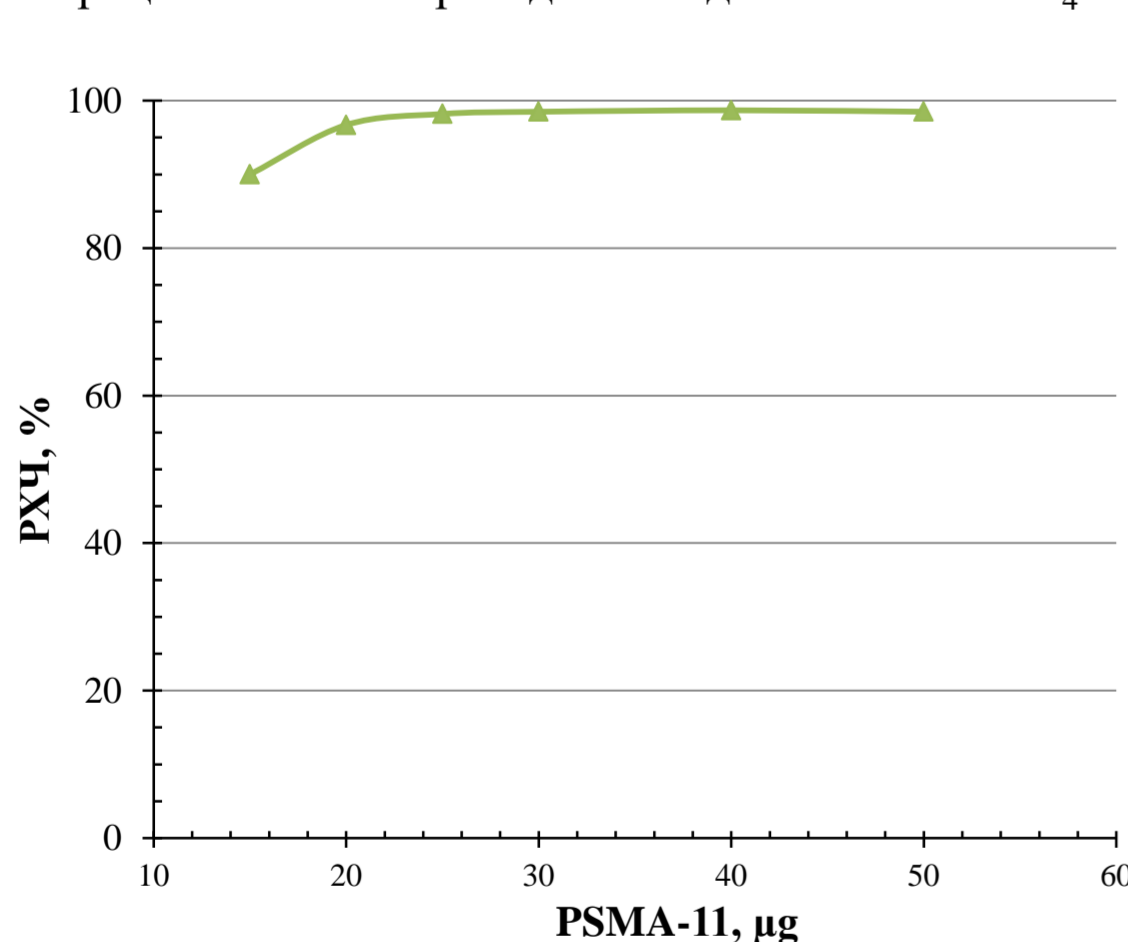


Рисунок 3. Влияние количества PSMA-11 на радиохимическое мечение РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11, n=6

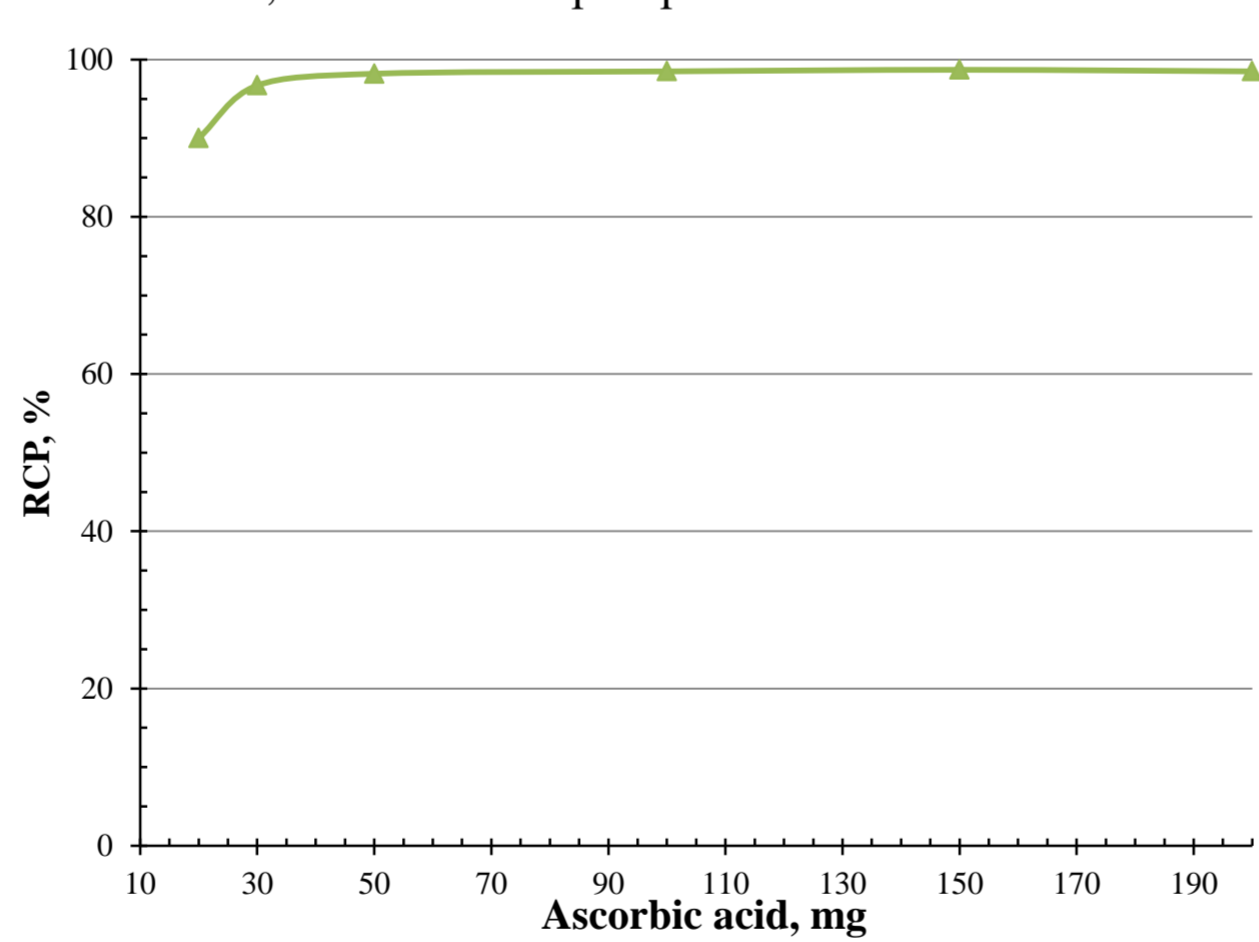


Рисунок 4. Влияние количества Аскорб. к-ты на радиохимическое мечение РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11, n=6

Из результатов исследований (Рис.5) видно, что при синтезе лиофилизата ФК [PSMA-11] не включая в состав набора винно-кислого натрия (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>·x2H<sub>2</sub>O) РХВ мечения [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 составляет на уровне на 70,2 ±1,9%, после включения в состав ФК PSMA-11 ингредиента виннокислого натрия (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>·x2H<sub>2</sub>O) в количестве 10 мг/флакон значение РХВ мечения [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 повысился на 10%, а при увеличении содержания ингредиента виннокислого натрия до 20 мг/флакон РХВ мечения [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 повышался до 99,0%.

Также включение в состав ФК ещё одного ингредиента L-цистеина (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S) в количестве 1,2 мг/флакон, при синтезе лиофилизата [PSMA-11] привел к стабильному высокому РХВ мечения [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11. Это объясняется тем, что, по-видимому, присутствие L-цистеина в составе лиофилизата [PSMA-11] в совокупности с виннокислым натрием не дает окислению двухвалентного олова в процессе синтеза образовав комплекс с олова двухвалентным.

## Закключение.

Исследованы условия синтеза лиофилизата ФК [PSMA-11] с определением оптимальных соотношений ингредиентов, чтобы достичь высокую радиохимическую мечения пептида-лиганда PSMA-11 радионуклидом <sup>99m</sup>Tc. Результаты исследований показали, что синтез лиофилизата ФК [PSMA-11] с содержанием ингредиентов пептида-лиганда PSMA-11, виннокислого натрия и L-цистеина составляла 25 мкг; 20 мг и 1,2 мг/флакон соответственно.

Таким образом, на основе предложенного способа синтеза лиофилизата ФК [PSMA-11] в совокупности предложенных соотношений ингредиентов привели к решению поставленной цели. В результате получали РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 с радиохимическим выходом и радиохимической чистотой более 98,0±0,5%.

На основе результатов исследований разработана технология синтеза лиофилизата ФК [PSMA-11] и РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 мечение техницием-99m со стабильно высоким РХВ и РХЧ, а также проведены доклинические исследования, но это уже предмет исследования другой работы.

Как видно из рисунков 3 и 4, при синтезе лиофилизата ФК с содержанием пептида-лиганда PSMA-11 менее 25 мкг радиохимический выход мечения низкая, а при более 25 мкг остается стабильно максимально, а в случае с аскорбиновой кислотой высокий процент радиохимического мечения наблюдается при количестве аскорбиновой кислоты 50 мг и более в лиофилизате ФК. При мечение лиофилизата ФК [PSMA-11] техницием-99m с количеством пептида-лиганда PSMA-11 менее 20 мкг способствовал образованию гидролизованного <sup>99m</sup>Tc и это привело к снижению РХВ мечения. Также при процессе мечения с количеством аскорбиновой кислоты ниже 50 мг/мл в реакционной смеси РХВ реакции мечения составляло ниже 90%, а это возможно связано с недостаточности емкости буферизуемой системы.

Для получения РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11 со стабильно высокой РХЧ исследовали влияние виннокислого натрия и L-цистеина на выход радиохимического мечения. Для этого синтезировали лиофилизаты ФК [PSMA-11] с различными количествами ингредиентов виннокислого натрия и L-цистеина с последующего синтеза РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11. Результаты исследований приведены на рисунках 5 и 6.

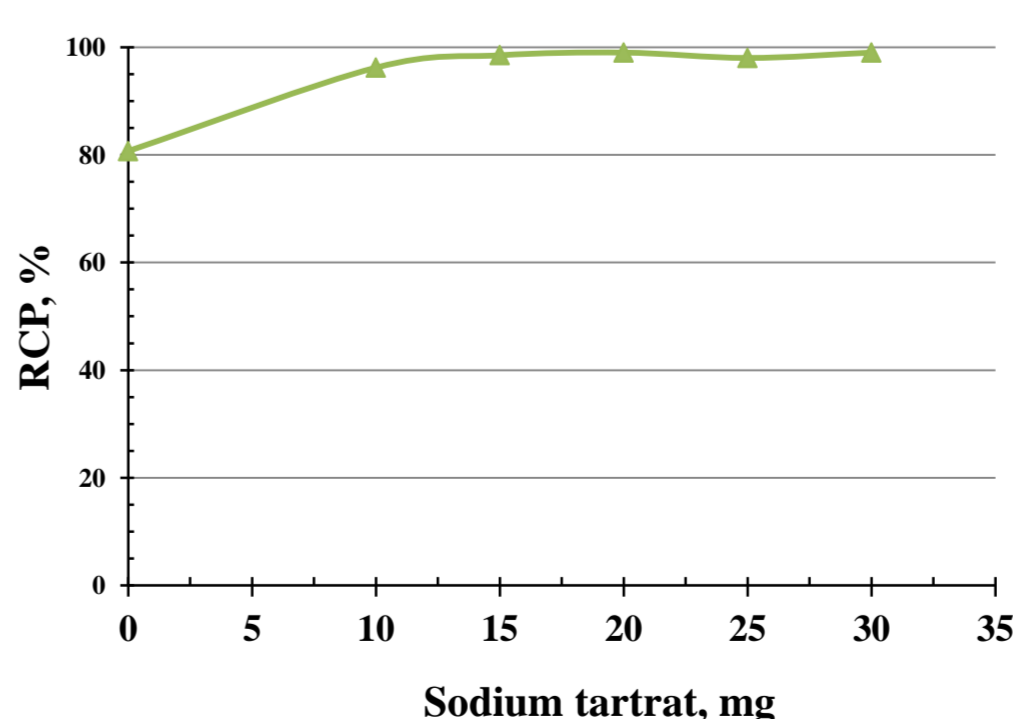


Рисунок 5. Влияние количества C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub> на радиохимическое мечение РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11, n=6

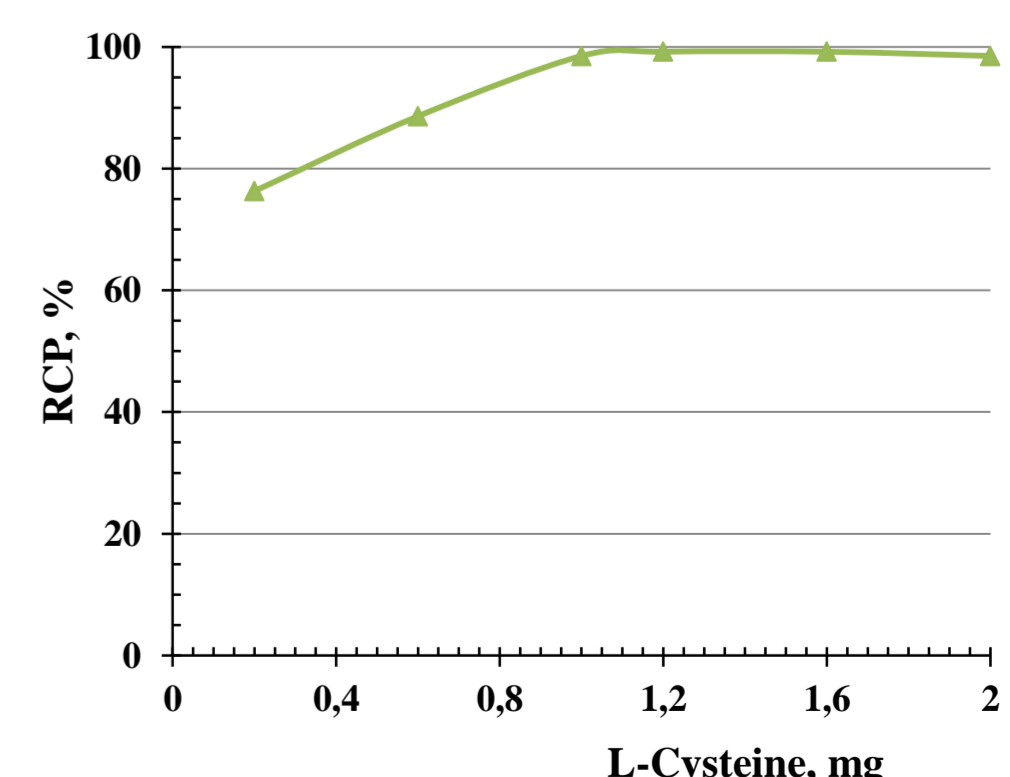


Рисунок 6. Влияние количества L-цистеина на радиохимическое мечение РФП [<sup>99m</sup>Tc]-PSMA-11, n=6

## REFERENCES

1. Cuccurullo V., Stasio G. D. Di, and Mansi L. et al/// World Journal Nuclear Medecine, 2018, 17, 70–78.
2. Fendler WP, Eiber M, Beheshti M, Bomanji J, Ceci F, Cho S, et al.// Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2017;44:1014–24.
3. Schmidkonz C, Hollweg C, Beck M, Reinfelder J, Goetz TI, Sanders JC, et al.// The Prostate. 2018; 78:54–63.
4. Reinfelder J, Kuwert T, Beck M, Sanders JC, Ritt P, Schmidkonz C, et al.// Clin Nucl Med. 2017;42:26–33.