



на правах рукописи

ПОДРЕЗОВА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

Технологические основы получения ω -дипиридил
замещенных кислот для производства радиофармпрепаратов
на основе технеция-99м

Специальность: 05.17.04 – Технология органических веществ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск 2021

Работа выполнена в **Исследовательской школе химических и биомедицинских технологий (ИШХБМТ)** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «**Национальный исследовательский Томский политехнический университет**».

Научный руководитель: **Юсубов Мехман Сулейман оглы**
доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Терентьев Александр Олегович**
доктор химических наук, член-корреспондент РАН, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, зав. лаб. исследований гомолитических реакций (№13), г. Москва

Бакулев Василий Алексеевич
доктор химических наук, профессор, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (УрФу), зав. кафедрой Технологии органического синтеза, г. Екатеринбург

Защита диссертации состоится «2» июня 2021 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.22 при ФГОУ ВО Национальном исследовательском Томском политехническом университете по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 43а, 2-й корпус ТПУ.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского, 55 и на сайте **dis.tpu.ru**.

Автореферат разослан « » 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДС.ТПУ.22



М.Е. Трусова

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Радиофармпрепараты (РФП) используют для диагностики онкологических заболеваний. В России в практической медицине используются около 22 РФП для компьютерной томографии и 5-7 для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). По экспертным данным, потребность населения России в РФП удовлетворяется не более чем на 1-3%. В связи с этим, одной из важнейших задач современной химической технологии является **разработка новых методов получения прекурсоров** для производства РФП.

Значительное место в диагностике и терапии занимают РФП на основе изотопов технеция-99м и рения-188 соответственно. Тем не менее, современные требования в РФП устанавливают новые стандарты в данной области. На сегодняшний день использование «чистых» изотопов или их хелатов является неоправданным, в силу широкого распределения по органам и тканям человека и необходимости использовать высокие дозы препаратов. Именно поэтому, современные исследования в данной области фокусируются на создании гибридных препаратов, имеющих в структуре как хелатирующий центр, так и центр, ответственный за распознавание специфических рецепторов, обеспечивающий «нацеливание» препарата в специфический орган. Одной из главных задач в данной области является введение в структуры прекурсоров лигандов с высокой хелатирующей способностью для прочного связывания технеция-99м.

В связи с этим **актуальной задачей** является разработка технологий синтеза доступных и эффективных **прекурсоров**, содержащих хелатирующие группы, для введения радиоизотопных меток в структуру таргетных молекул – **лигандов** для адресной доставки в целевой орган.

Целью диссертационного исследования является разработка новой технологии синтеза прекурсоров для **направленного и контролируемого введения хелатирующих групп в структуру** целевых **биомолекул** для последующего связывания с изотопами технеция-99м.

Работа включает в себя решение следующих взаимосвязанных **задач**:

1) Разработка методов синтеза ω -производных алифатических карбоновых кислот как прекурсоров для получения хелат-содержащих линкеров для мечення биомолекул.

2) Разработка методов синтеза металлохелаторов, содержащих фрагмент ω -производных алифатических карбоновых кислот для связывания с целевыми биомолекулами.

3) Разработка методов получения прекурсоров радиофармпрепаратов с использованием линкеров, содержащих хелатирующие группировки, и векторов

для доставки в специфические органы и ткани (адресных молекул белковой природы с антикириновыми повторами (DARPin); ингибитора к простат-специфическому мембранному антигену (ПСМА); циклического октапептида (октреотида)).

4) Разработка технологической схемы синтеза **прекурсоров** радиофармпрепаратов и методов контроля их качества.

Финансовая поддержка:

1. Грант РНФ №16-13-10081;

2. Мегагрант Министерства науки и высшего образования (Соглашение № 2019-220-07- 0919;

3. Государственный контракт № 14. N08.11.0163 от «31» августа 2017 г. в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

4. Доклинические исследования радиофармацевтического препарата на основе меченного ^{99m}Tc октреотида для радионуклидной диагностики нейроэндокринных опухолей. ГК № 14.N08.11.0166 от 05 августа 2017 г.

5. Доклинические исследования радиофармацевтического препарата на основе меченных ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией HER-2/neu» ГК № 14.N08.11.0163 от «31» августа 2017 г.

Научная новизна

1. Разработаны общие подходы к получению ω -иод-замещенных алифатических карбоновых кислот путем окислительного расщепления простых и доступных алициклических кетонов.

2. Разработаны фундаментальные основы технологии производства бифункциональных хелатирующих агентов, содержащих сукцинимидную группу на основе ω -производных алифатических карбоновых кислот.

Практическая значимость

1. Разработана удобная и воспроизводимая технология синтеза универсальных линкеров на основе ω -замещенных алифатических кислот и их эфиров с использованием **доступного** сырья.

2. Предложен простой и эффективный метод получения широкого ряда хелаторов на основе сложных эфиров ω -иодалифатических кислот.

3. Предложена лабораторная технология синтеза **прекурсоров** РФП на основе DARPin, ингибитора ПСМА, октреотида с использованием полученных бифункциональных хелатирующих агентов.

По результатам работы сформулированы **положения**, выносимые на защиту:

1. Получение ω -иодалифатических карбоновых кислот и эфиров на основе реакции окислительного расщепления циклических кетонов.
2. Синтез бифункциональных хелатирующих агентов на основе ω -иодалифатических карбоновых кислот и эфиров.
3. Химическая модификация адресных молекул с полученными бифункциональными хелатирующими агентами.

Достоверность полученных данных была обеспечена за счет использования современных аналитических методов с целью установления строения и чистоты продукта и полупродуктов (использовались ЯМР-, ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, элементный анализ, ВЭЖХ, спектрофотометрия, температура плавления).

Апробация результатов работы:

Отдельные части работы докладывались и обсуждались на 18 специализированных конференциях, симпозиумах и семинарах всероссийского и международного уровней, среди которых выделяются «Mendeleev 2015» в Санкт-Петербурге, Высокие технологии в современной науке и технике (BTCNT-2016), Международная научная студенческая конференция МНСК-2017 (Новосибирск), «Molecules and Systems for Diagnostics and Targeted Therapy» (MSDT-2017), «Актуальные проблемы органической химии-2018» (Новосибирск – Шерегеш), V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии, 2018 (Владикавказ), Markovnicov Congress on Organic Chemistry 2019, Москва – Казань.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей и 6 патентов РФ, 18 материалов докладов на конференциях различного уровня.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, списка литературы из 156 наименования. Работа изложена на 154 страницах, содержит 24 рисунков, 27 схем, 21 таблиц, 27 приложений.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.х.н. **Юсубову М.С.** (ИШХБМТ ТПУ), а также к.х.н. **Постникову П.С.** (ИШХБМТ ТПУ) за всестороннюю помощь и поддержку в написании диссертационной работы. Автор выражает огромную благодарность к.фарм.н. **Ларькиной М.С.** (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) за помощь в планировании и выполнении экспериментов, интерпретации данных и советы в написании диссертационной работы, а также директору ИШХБМТ ТПУ **Трусовой М.Е.** за активное участие в обсуждении отдельных глав диссертации.

Основное содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и основные задачи исследований, показаны научная новизна, практическая значимость и личный вклад автора. Приведены результаты апробации работы и публикации по теме, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе (Технологии получения радиофармпрепаратов: основные методы и подходы) рассмотрены основные аспекты применения РФП в визуализации в радионуклидной диагностики (ОФЭКТ и ПЭТ), кратко представлена история развития РФП на основе технеция-99м (РФП первого, второго и третьего поколений). Представлены особенности производства ^{99m}Tc -содержащих РФП из радионуклидного генератора $\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, технология получения основных бифункциональных хелатирующих агентов (БФХА), а также представлены основные подходы к связыванию хелатирующих агентов с биомолекулами (биокоњугации).

Вторая глава (Разработка технологии получения бифункциональных хелатирующих агентов и их использование) посвящена описанию результатов разработки технологии получения БФХА и химической модификации биологически активных соединений (адресных молекул белковой природы с антикириновыми повторами (DARPin); ингибитора к простат-специфическому мембранному антигену (ПСМА); циклического октапептида (октреотида)).

2.1. Окислительное расщепление кетонов

Проведенный анализ современных источников литературы, описывающих основные подходы к синтезу РФП, показывает исключительную ценность алифатических кислот с терминальными хорошо уходящими группами в алкильном фрагменте **как прекурсоров** (рисунок 1).

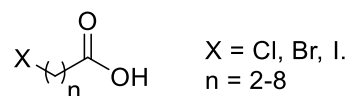


Рисунок 1 – Общая структура алифатических кислот с терминальными хорошо уходящими группами

Собственно, одной из основных задач современной технологии синтеза РФП является целенаправленный поиск синтетических методов для получения кислот данного типа и разработка технологических решений для их эффективного и низкочередного производства.

Для получения ω -замещенных карбоновых кислот предпочтительно использование лактонов либо кетонов в качестве субстратов. Однако окислительные системы для их расщепления основаны на использовании пероксикислот и пероксидов в высоких концентрациях. Данные методы плохо

совместимы с галоид-производными, особенно иод-содержащими. Отсутствие удобных и безопасных систем расщепления кетонов являлось основной предпосылкой исследования.

2.1.2 Подбор условий окислительного расщепления кетонов

На первом этапе наших исследований был проведен подбор окислительной системы для расщепления циклических кетонов. При выборе окислителей мы руководствовались соображениями безопасности, доступности и дешевизны реагентов, например, Оксон (OXONE), иодат калия и пероксид водорода (табл. 1). Условия реакции были оптимизированы с использованием циклогексанона **1a** в качестве модельного соединения.

Табл. 1 – Влияние окислителя на расщепление циклогексанона **1a**

№	Окислитель	1a	2a	3a	4
1	Охоне	-	-	-	+
2	KIO ₃	+	-	+	+
3	H ₂ O ₂	-	+	+	-

При проведении расщепления **1a** в присутствии Оксона, по данным ГХ-МС и ¹H ЯМР спектров в реакционной массе отсутствовал основной продукт расщепления **2a**, а также капролактон и

исходный кетон (**1a**). Согласно протонному спектру при окислении Охоне образуются только гидроксипроизводные кислоты (**4**). Действие KIO₃ приводило к образованию смеси гидрокси- (**4**) и иодгексановой кислот (**3a**) с неполной конверсией. Использование перекиси водорода в качестве окислителя является более предпочтительным, в силу экологичности данного реагента, поскольку единственным побочным продуктом является вода. В случае использования пероксида водорода, хлорида меди (I) и молекулярного иода мы фиксировали образование двух продуктов: метил 6-иодгексаноата (**2a**) и 6-иодгексановой кислоты (**3a**). Поэтому в дальнейшей работе была использована эта окислительная система.

2.1.3 Поиск оптимального растворителя

На следующем этапе мы провели оптимизацию растворителя (табл. 2). Так образование иодзамещенных кислот и эфиров с хорошими выходами мы наблюдали только в случае использования спиртов (табл. 2, 1-4). Соотношение эфир:кислота сильно зависит от природы спирта; и выход кислот резко увеличивается при переходе от MeOH к *t*-BuOH. При этом реакции в MeOH и EtOH (табл. 2, 1-2) дают эфиры в качестве основных продуктов, а в *i*-PrOH и *t*-BuOH - 6-иодгексановую кислоту (**3a**) (табл. 2, 3-4). Использование апротонных растворителей приводило к образованию продуктов (**3a**) и (**4**) (табл. 2, 5-6). Единственным продуктом, наблюдаемым в следовых количествах в воде, была 6-гидроксигексановая кислота (**4**) (табл. 2, 7).

Табл. 2 – Влияние природы растворителя на окисление циклогексанона **1a**

№	Растворитель	2a (R), выход (%)	3a, выход (%)	4, выход (%)
1	MeOH	75 (Me)	24	-
2	EtOH	55 (Et)	40	-
3	i-PrOH	3 (i-Pr)	75	-
4	t-BuOH	-	84	-
5	CH ₃ CN	-	18	7
6	THF	-	24	8
7	H ₂ O	-	-	<1

Таким образом, варьируя природу растворителя можно менять направление процесса. В частности, использование *t*-BuOH в качестве растворителя приводит к исключительному образованию продукта

(**3a**).

2.1.4 Влияние размера цикла на окислительное расщепление

Найденные условия позволили нам окислить ряд кетонов **1** с различным размером цикла (табл. 3) с использованием метанола или этанола в качестве растворителей. Окисление пятичленных и шестичленных циклов протекает хорошо с образованием соответствующих продуктов.

Табл. 3– Получение ω-иодоалифатических карбоновых кислот и эфиров

 R ¹ : 3a , H, 24% (8 h) 2a , Me, 75% (8 h)	 R ¹ : 3b , H, 18% (8 h) 2b , Me, 70% (8 h)	 R ¹ : 3h , H, 5% (24 h) 2h , Me, 68% (24 h)	 R ¹ : 3i , H, 5% (36 h) 2i , Et, 55% (36 h)
 R ¹ : 3d , H, 3% (14 h) 2d , Me, 54% (14 h)	 R ¹ : 3e , H, 5% (16 h) 2e , Me, 40% (16 h)	 R ¹ : 3f , H, -% (- h) 2f , Me, 68% (14 h)	 R ¹ : 3g , H, 10% (14 h) 2g , Me, 75% (14 h)
 R ¹ : 3c+3c' , H, -% (- h) 2c+2c' , Me, 57% (14 h)	 R ¹ : 3c+3c' , H, -% (- h) 2c+2c' , Me, 57% (14 h)	 R ¹ : 3j+3j' , H, -% (- h) 2j+2c' , Me, -% (- h)	 R ¹ : 3j+3j' , H, -% (- h) 2j+2c' , Me, -% (- h)

^a Условия реакции: 6 ммоль циклогексанона, 3 ммоль I₂, 0,6 ммоль CuCl, 18 ммоль H₂O₂, MeOH, к.т., 8–36 ч;

Интересным являлось преимущественное образование эфиров в случае замещенных циклогексанонов (Me, Pr, *t*-Bu) (табл.3, 3-7). Стерически затруднённый 2,6-диметилциклогексанон закономерно не окислялся (табл. 3,

10). В случае окисления 3-метилциклогексанона, мы наблюдали смесь продуктов (табл. 3, 3). Циклы больших размеров, а именно циклогептанон и циклооктанон окислялись дольше (табл. 3, 8-9), причем проведение реакции даже в течение 56 часов и увеличение количества окислителя до 24 ммоль не приводило к полному превращению кетонов в соответствующие продукты.

2.1.5. Контроль конверсии в реакции расщепления кетонов

Для контроля конверсии расщепления циклических кетонов и контроля содержания посторонних примесей была разработана и валидирована аналитическая методика с использованием **1a**, **2a** и хлорбензола в качестве внутреннего стандарта. Пример ГХ-хроматограммы представлена на рисунке 4.

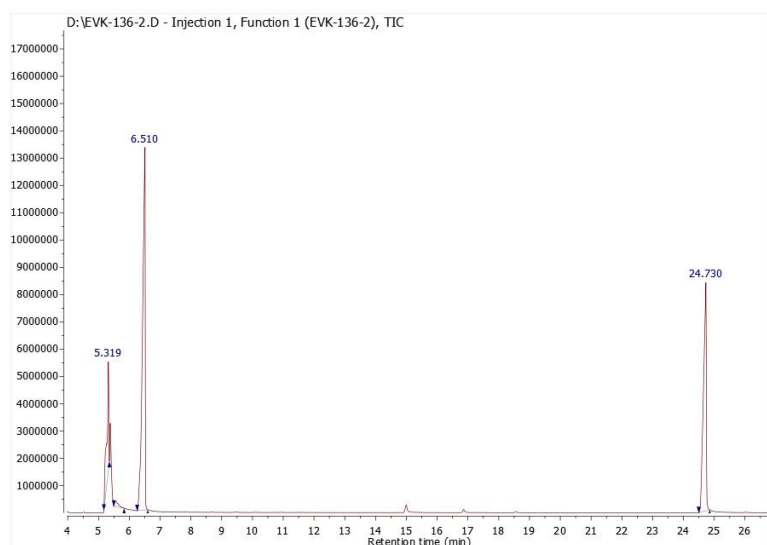


Рисунок 4 — ГХ-хроматограмма с внутренним стандартом. Пики соответствовали хлорбензолу, циклогексанону (**1a**) и метил 6-иодгексаноату (**2a**) с временами удерживания 5,319, 6,510 и 24,730 мин соответственно.

Таким образом, была разработана и валидирована методика количественного определения циклогексанона (**1a**) и метилового эфира 6-иодгексановой кислоты (**2a**) методом ГХ-МС. Разработанная методика может быть использована контроля подлинности ω -иодалифатических эфиров в синтезе прекурсоров РФП.

2.2. Синтез бифункциональных хелатирующих агентов

Современная структура радиофармпрепаратов состоит из четырех главных структурных единиц (таргетная молекула, линкер, бифункциональный хелатирующий агент и радионуклид — технеций). Одной из главных задач в технологии получения визуализирующих агентов на основе технеция является разработка методов введения линкера в структуру хелатирующих агентов, например тридентантных ди(2-пиридилметиламино)алифатических кислот (**6**).

Для их получения, мы использовали эквимольные количества ω -иодалифатических эфиров (**2a-g**) и ди-(2-пиколил)амин с добавлением триэтиламина в среде изопропанола (схема 4).

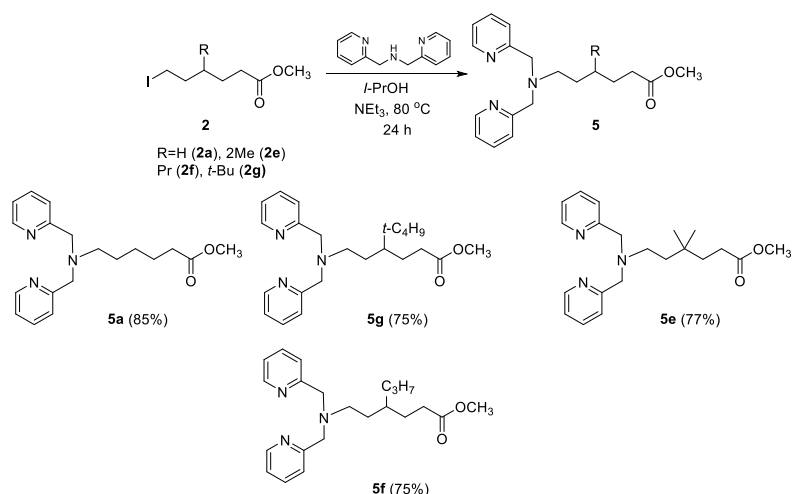


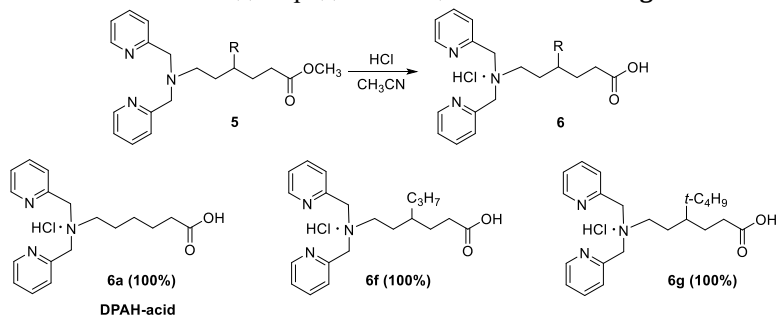
Схема 4 – Синтез ω -дипиридил замещенных эфиров **5a-f**

Оптимальной температурой для проведения этого процесса является 80 °С. В этих условиях мы получали продукты N-алкилирования **5a-g** с хорошими выходами (схема 4).

Следующей технологической задачей являлся подбор

условий для гидролиза. Экспериментальным путем было выяснено, что кислотный гидролиз (схема 5) является более предпочтительным, чем расщепление С-О связи действием оснований.

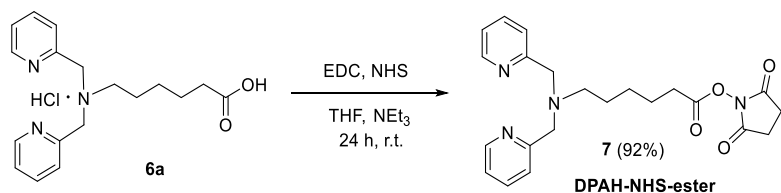
Схема 5 – Синтез ω -дипиридил замещенных кислот **6a-g**



Кислоты (**6a-g**) были выделены с количественными выходами в виде гидрохлоридов после отгонки растворителя. Далее, мы использовали известный подход карбодиимидной

активации карбоновых кислот с последующим получением N-сукцинимидных эфиров с использованием NHS и EDC в тетрагидрофуране. Таким образом, нами были подобраны условия процесса получения NHS-эфиров ω -ди-(2-пиридилметиламино)алкановых кислот (время, температурный режим, растворитель). Реакция протекает при комнатной температуре в среде тетрагидрофурана в присутствии NHS/EDC в течение 24 часов с выходом 92% (схема 6).

Схема 6 – Способ получения сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноата (7)



Полученные ω -дипиридил замещенные кислоты **6a-g** были апробированы в радиосинтезе с ^{99m}Tc . Данные,

представленные в таблице 4 показывают высокие радиохимические выходы (РХВ) (более 80%), в том числе изолированные (более 66%) и радиохимическую чистоту более 97%.

Таблица 4 – РХВ, изолированный выход, РХЧ ω -бис(пиридин-2-илметил)амино)алифатических кислот, меченных технецием- 99m Тс¹.

Радиокомплекс	РХВ*, %	Изолированный выход**, %	РХЧ, %	Специфическая активность, МБк/мкг
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексановая кислота}$	95 ± 2	81 ± 1	98 ± 1	1,52
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)-4-пропилгексановая кислота}$	85 ± 2	68 ± 2	97 ± 1	1,36
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)-4-третбутилгексановая кислота}$	86 ± 1	65 ± 1	98 ± 0	1,38
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)-4,4-диметилгексановая кислота}$	87 ± 0	69 ± 0	98 ± 1	1,39

Примечание: *РХВ основан на радио-ТСХ неочищенного продукта;

**изолированный выход определяется как процент активности очищенного продукта к общей активности.

2.3 Технология РФП: Примеры химической модификации биологически активных соединений²

Одной из отличительных особенностей производства РФП является малый масштаб производства, не требующего строительства фармацевтических заводов. Производство радиофармпрепаратов, в отличие от обычных лекарственных препаратов, осуществляется в небольших количествах и, как правило, на производственном участке изготавливают 1, реже 2 наименования препарата, в количестве 5-10 флаконов. Содержание основного действующего вещества (прекурсора РФП) варьируется от 0,1 мкг до 20 мг на 1 флакон, что составляет от 0,1 мг – 200 мг на партию из 10 флаконов.

Для направленной доставки и воздействия на биологические мишени диагностического РФП, необходимо в структуру биомолекулы, которая имеет высокое сродство с рецепторами клеток-мишеней и высокоизбирательно связывается с ними ввести БФХА для дальнейшего связывания с ^{99m}Tc .

2.3.1 Модификация циклического октапептида – октреотида

Популярной адресной молекулой является аналог соматостатина – октреотид, который используется для диагностики и терапии нейроэндокринных опухолей (НЭО) тонкого кишечника и поджелудочной железы. На первом этапе работы была проведена защита амино-группы остатка *L*-лизина в структуре октреотида с использованием $(\text{Boc})_2\text{O}$ (ди-*трет*-бутилдикарбоната) с выходом 82%. Введение в структуру $\text{Boc-(L-Lys)-Октреотида}$ хелатирующего агента (7)

¹ Работа выполнена сотрудниками лаборатории № 31 Ядерного реактора НИ ТПУ

² Работа выполнена совместно с к.фарм.н. Ларькиной Марией Сергеевной (СибГМУ), с сотрудниками лаборатории ядерного синтеза №31 (НИ ТПУ), с сотрудниками НИИ онкологии Томского национального исследовательского центра (НИМЦ) РАН.

проводили в среде ДМФА в присутствии триэтиламина при комнатной температуре в течение 4 часов.

Экспериментально установлено, увеличение температуры способствовало протеканию побочных реакций, связанных с разложением хелатирующего агента ДРАН-NHS-ester (7), а увеличение времени незначительно сказывалось на выходе биоконъюгата ДРАН-(D-Phe)-Boc-(L-Lys)-Октреотида (схема 8).

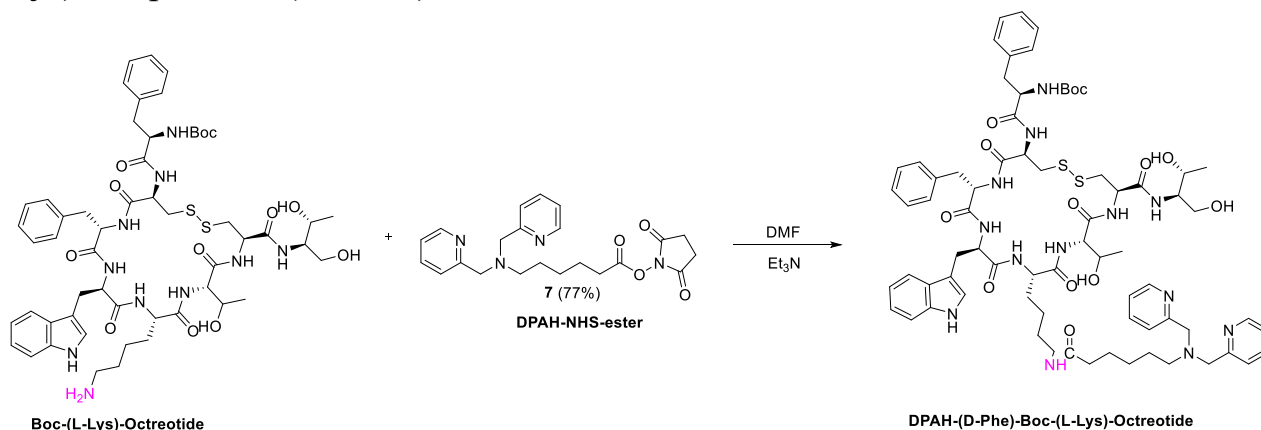


Схема 8 – Общая схема получения ДРАН-(D-Phe)-Boc-(L-Lys)-Октреотида

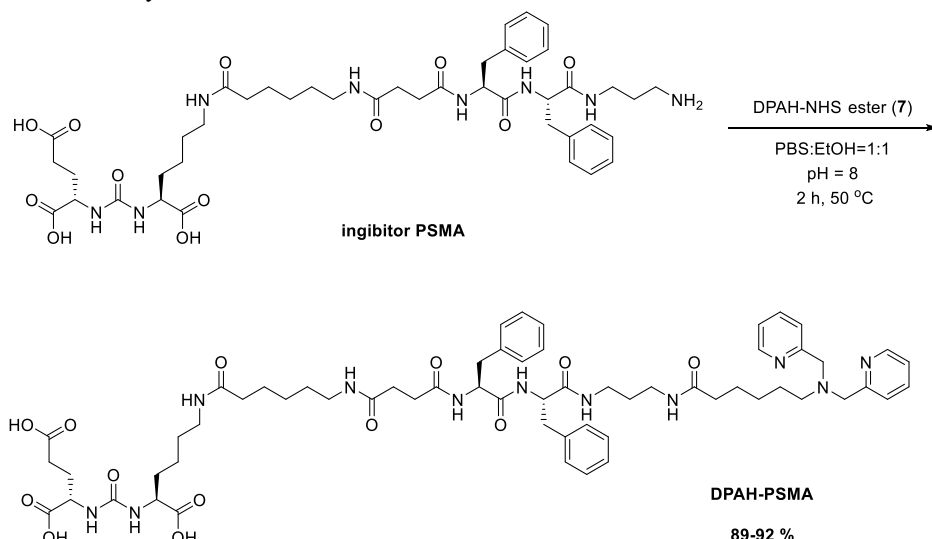
И на последней стадии проводили гидролиз ДРАН-(D-Phe)-Boc-(L-Lys)-Октреотида смесью ТФА:метиленхлорид (1:1) в течение 2 часов при комнатной температуре с выходом 82%. Радиохимический выход $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ДРАН-Октреотида составил более 80%, а радиохимическая чистота комплекса составляла более 96%.

Для контроля образования продукта был разработан аналитический метод ВЭЖХ для определения ДРАН-октреотида. Параметры разработанной методики (специфичность, линейность, предел обнаружения т.д.) удовлетворяют требованиям для аналитических методов.

2.3.2 Модификация ингибитора к простат-специфическому мембранному антигену (ПСМА)

В России рак предстательной железы (РПЖ) занимает 4-е место, при этом, у 60-80% пациентов при первичном обследовании выявляются местнораспространенные формы рака или метастатические поражения отдаленных органов и тканей. Для первичной диагностики в качестве стандартного биомаркера используют простатспецифичный мембранный антиген (ПСМА). В качестве ингибиторов используются конъюгаты на основе мочевины (карбамида) с различными аминокислотами. Однако, одним из перспективных ингибиторов является (Glu-urea-Lys-дифенил-ПСМА-лиганд), который был нам представлен научной группой под руководством проф. Мажугой А.Г. (МГУ им. М. В. Ломоносова и РХТУ им. Д. И. Менделеева).

Схема 9 – Общая схема получения ДРАН-ПСМА



Установлено, что для модификации ПСМА ингибитора наиболее предпочтительным в использовании является PBS (pH = 8.5) с EtOH или MeCN (1:1) (выход 82%). Увеличение температуры способствовало протеканию побочных реакций, связанных с разложением хелатирующего агента ДРАН-NHS-ester (7), а увеличение времени незначительно сказывалось на выходе биоконъюгата ДРАН-ПСМА. Таким образом, нами была разработана технология модификации ингибитора ПСМА. Выход биоконъюгата ДРАН-ПСМА составил 91%. Радиохимический выход ^{99m}Tc -ДРАН-ПСМА составил более 60%, а радиохимическая чистота комплекса составляла более 97%.

2.3.3 Модификация адресных молекул белковой природы с антикириновыми повторами (DARPin)

В настоящее время одним из наиболее изученных и часто упоминаемых в литературе опухолевых антигенов является поверхностный рецептор HER2/neu, который гиперэкспрессирован во многих человеческих карциномах (рак молочной железы, легких, желудка, яичников, простаты). Альтернативой адресным антителам и их фрагментам являются рекомбинантные адресные молекулы белковой природы с антикириновыми³ повторами (DARPin), являющиеся специфичными к рак-ассоциированному антигену HER2/neu. Главными преимуществами DARPin являются высокая специфичность и аффинность к антигену, небольшой размер (14-20 кДа), а также низкая стоимость их производства. Ввиду того, что прямое введение радиоизотопной метки в структуру DARPin не представляется возможным, для этих целей необходимо проводить его дополнительную модификацию – введение бифункционального

³ Анкирины – белок клеточной мембраны, участвующий в прикреплении клетки к подложке при культивировании.

хелатирующего агента на основе ω -бис(пиридин-2-илметил)амино)алифатической кислоты (7).

Экспериментальные образцы кодирующей последовательности DARPIn9_29 были наработаны лабораторией молекулярной онкологии Института биоорганической химии им. Академика М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН под руководством академика РАН Деева Сергея Михайловича. Рекомбинантные адресные молекулы DARPIn9_29 имеют несколько остатков ε -аминогрупп *L*-лизина и свободных амино-групп (N-концов), по которым может пойти образование амидной связи с DPAH-NHS (7) (схема 10).

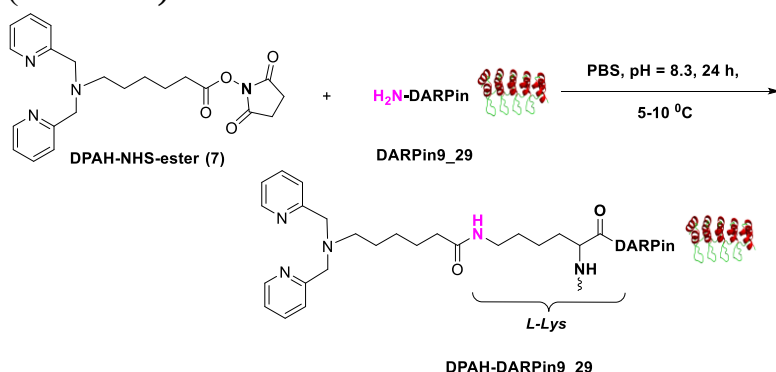


Схема 2.10 – Схема получения DPAH-DARPIn9_29

На первом этапе работы была изучена зависимость условий модификации от pH среды. Оптимальным значением pH являлся диапазон pH 8,3-8,5. В качестве соразтворителя нами

был выбран PBS с добавлением 20% ацетонитрила. При определении времени и температурного режима модификации, в первую очередь учитывалась неустойчивость DARPIn при хранении, как при комнатной температуре, так и при нагревании. Поэтому оптимальными условиями для модификации являются 2 часа при комнатной температуре и выдерживание смеси 24 ч при температуре 5-10 °C. Радиохимический выход ^{99m}Tc -DPAH-DARPIn9_29 составил более 75%, а радиохимическая чистота комплекса составляла более 96% после очистки гелефильтрацией.

Для изучения специфичности накопления полученного препарата на ^{99m}Tc -DPAH-DARPIn9_29 была выбрана клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека BT-474, которая характеризуется гиперэкспрессией рецептора Her-2/neu.

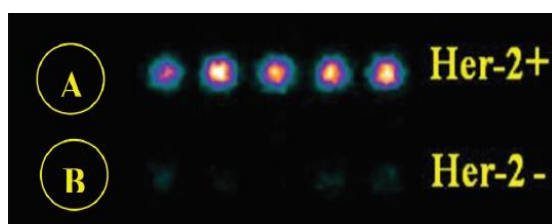


Рисунок 3 – Визуальная сцинтиграфическая оценка накопления ^{99m}Tc -DPAH-DARPIn9_29: А – клетки тканей злокачественных опухолей с гиперэкспрессией Her-2/neu (BT-474, Her-2/neu – позитивная, человеческая аденокарцинома молочной железы); В – клетки тканей злокачественных опухолей без гиперэкспрессии Her-2/neu (MCF-7, Her-2/neu – отрицательная, человеческая аденокарцинома молочной железы).

Доказательством селективного взаимодействия с препаратом являлась высокая аккумуляция препарата на поверхности исследуемой группы клеток.

При проведении визуальной скинтиграфической оценки значительно большая интенсивность накопления, изучаемого РФП отмечалась в культуре клеток с гиперэкспрессией поверхностного рецептора Her-2/neu (рисунок 3).

Результаты прямой радиометрии также продемонстрировали более высокое накопление радиофармацевтического препарата в клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека BT-474 с гиперэкспрессией Her-2/neu по сравнению с контрольной группой. При проведении доклинических испытаний *in vitro* показана высокая стабильность исследуемого соединения, а также его аккумуляция в группе клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu.

ГЛАВА 3. Экспериментальная часть. Представлены результаты экспериментальной работы и аналитические данные к продуктам и полупродуктам.

ГЛАВА 4. Принципиальная технологическая схема

Процесс производства прекурсоров РФП включает в себя следующие основные стадии:

I. Окисление кетонов, включает в себя 6 технологических процессов:

- ТП 1: Окисление кетона;
- ТП 2: Окисление иода;
- ТП 3: Экстракция ω -иодкарбоновых эфиров;
- ТП 4: Упаривание;
- ТП 5: Экстракция ω -иодкарбоновых кислот;
- ТП 6: Упаривание.

II. Алкилирование ω -иодкарбоновых эфиров (введение хелатирующего агента), включает в себя 3 технологических процесса:

- ТП 7: Алкилирование ω -иодкарбоновых эфиров;
- ТП 8: Очистка (колоночная хроматография);
- ТП 9: Упаривание.

III. Гидролиз ω -дипиридил замещенных эфиров, включает в себя 2 технологических процесса:

- ТП 10: Гидролиз;
- ТП 11: Упаривание.

IV. Получение сукцинимидных эфиров;

- ТП 12: Получение сукцинимидных эфиров;
- ТП 13: Экстракция сукцинимидных эфиров;
- ТП 14: Упаривание.

V. Биоконъюгация сукцинимидных эфиров с целевыми биомолекулами.

- ТП 15: Химическая модификация биомолекул;
- ТП 16: Очистка;
- ТП 17: Лиофилизация.

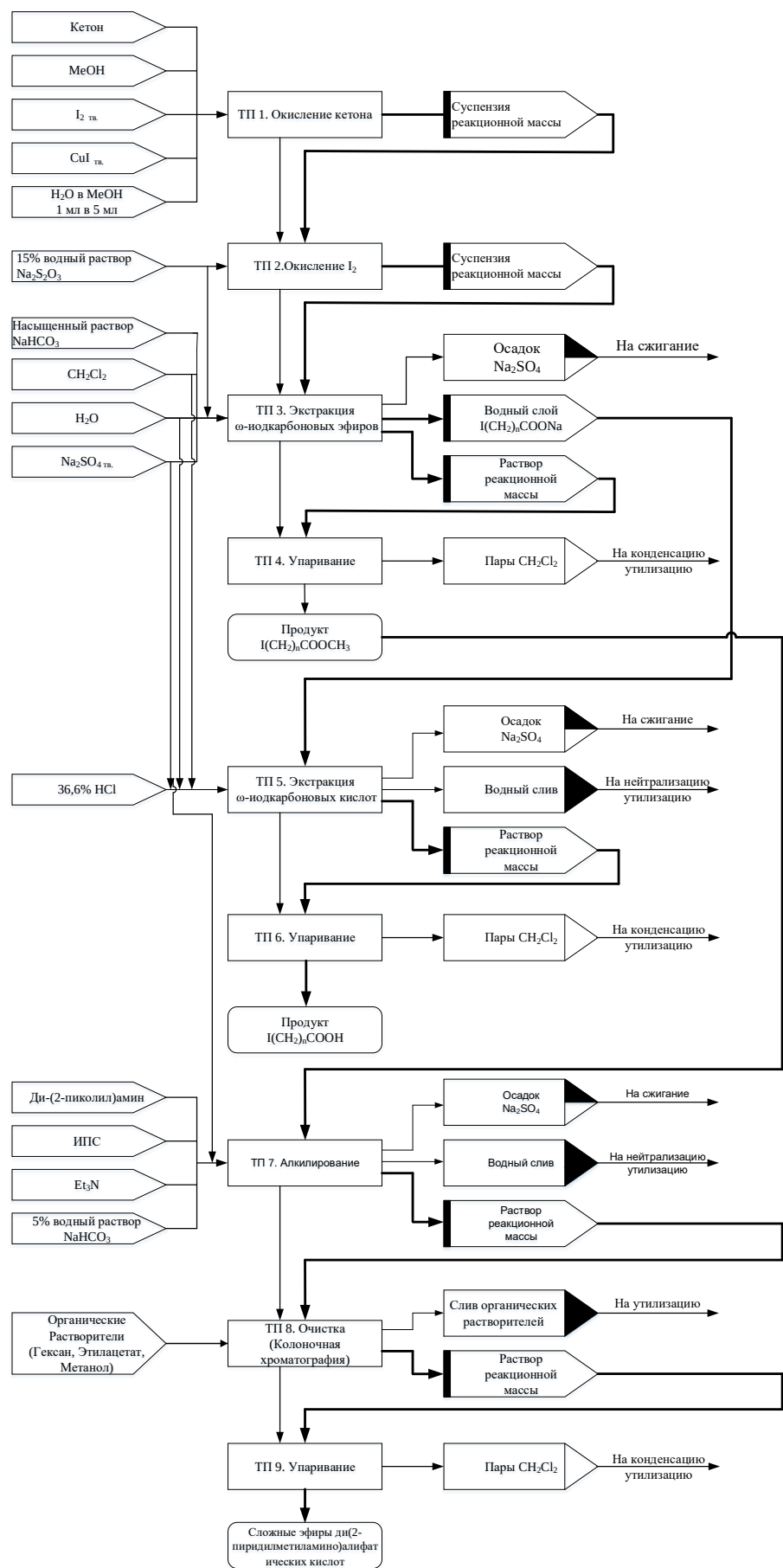


Рисунок 4 – Технологическая схема ТП 1 – ТП 9

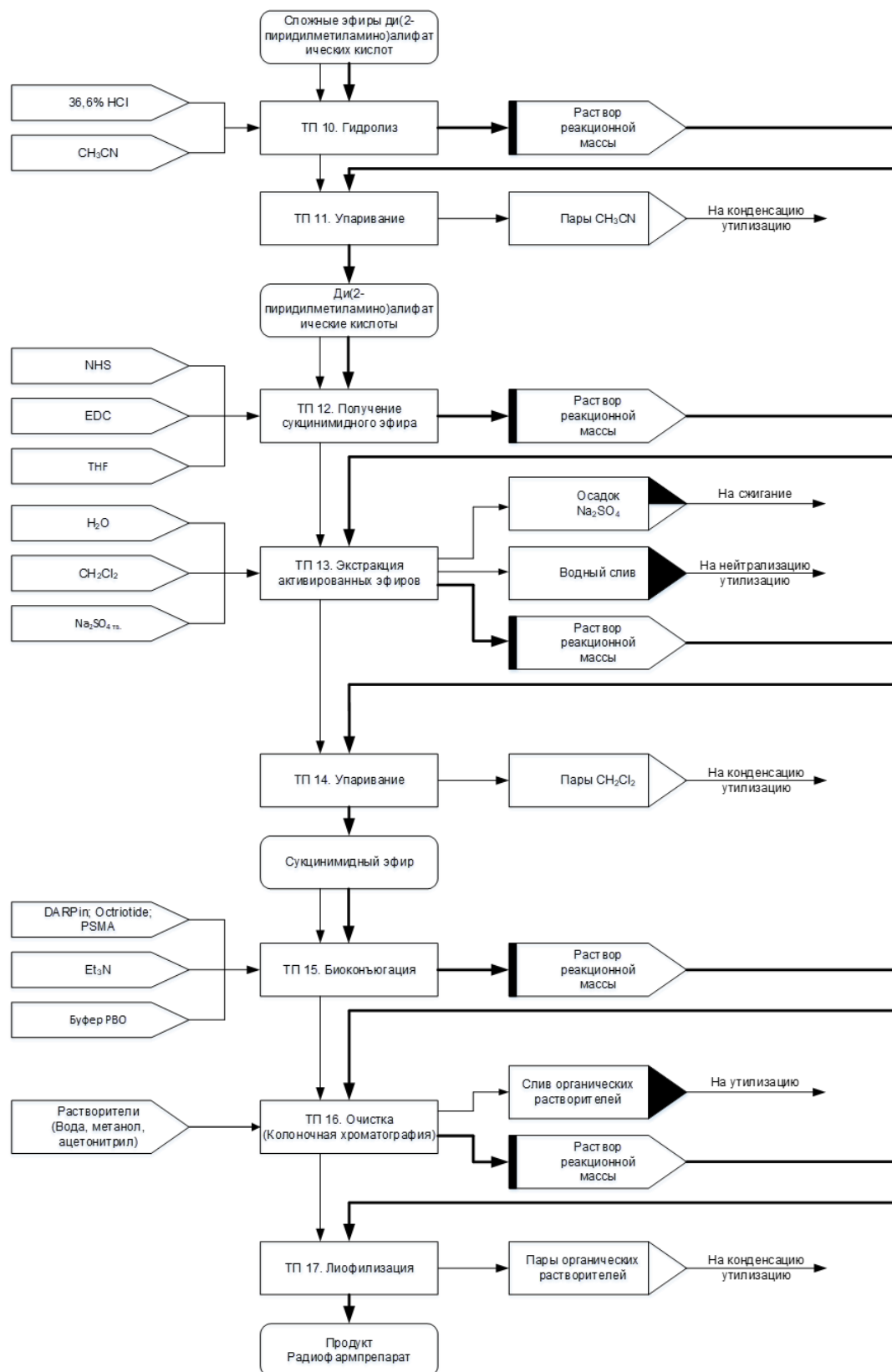


Рисунок 5 – Технологическая схема ТП 10 – ТП 17

Заключение

1. Разработан метод синтеза ω -иод-замещенных алифатических карбоновых кислот и их эфиров путем окислительного расщепления простых и доступных алициклических кетонов.
2. На основе ω -производных алифатических карбоновых кислот разработана удобная технология синтеза бифункциональных хелатирующих агентов, содержащих сукцинимидную группу.
3. Разработана технология синтеза прекурсоров радиофармпрепаратов на основе меченных изотопом технеция-99м.
4. Проведен анализ разработанной технологии с точки зрения безопасности для персонала и окружающей среды, который показал высокую степень ее безопасности и экологичности.
5. Разработанная принципиальная технологическая схема и рассчитанные технико-экономические показатели процесса могут быть реализованы в виде четырехстадийного синтеза 200 мг DPAH-NHS-ester (7) с суммарным выходом 59%.

В приложении приведены ^1H , ^{13}C , ИК-спектры, копии патентов и актов внедрения.

Основное содержание диссертации представлено в работах:

Статьи в Международных базах данных Scopus и Web of Science:

1. **Podrezova, E.V.** Expedient synthesis of long-chain ω -substituted fatty acids and esters from cyclic ketones using iodine and hydrogen peroxide / **E.V. Podrezova**, M.S. Larkina, M.V. Belousov, A. Kirschning, V.V. Zhdankin, M.S. Yusubov // Synthesis. – 2018. – Vol. 50. – No 20. – P. 4081-4088.
2. Larkina, M.S. Validation of an Analytical HPLC Method for a New Diagnostic Octreotide Derivative for Neuroendocrine Tumors / M.S. Larkina, S. V. Krivoshchekov, **E.V. Podrezova**, O.D. Bragina, V.I. Chernov, E.A. Nesterov, V.V. Bodenko, M.V. Belousov, M.S. Yusubov // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2019. – Vol. 53. – No 9. – P. 865-870.
3. **Подрезова, Е.В.** Валидация методики количественного определения циклогексанона в реакции окислительного расщепления методом газовой хроматографии –масс-спектрометрии = Validation of a GC-MS Method for Quantitative Determination of Cyclohexanone by Oxidative Cleavage / **Е.В. Подрезова**, М.С. Ларькина, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, М.К. Заманова, С.В. Кривошеков // Химико-фармацевтический журнал = Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2018. – Том 52. – №12. – С. 60-64.
4. Ларькина, М.С. Разработка способа получения производного октреотида для диагностики нейроэндокринных опухолей = Validation of an analytical HPLC method for a new diagnostic octreotide derivative for neuroendocrine

tumors / М.С. Ларькина, **Е.В. Подрезова**, О.Д. Брагина, Е.А. Тагирова, В.И. Чернов, М.С. Юсубов, Е.А. Нестеров, В.С. Скуридин, С.В. Кривошеков, Е.А. Янковская, Р.В. Гурто, М.В. Белоусов // Бюллетень сибирской медицины = Byulleten Sibirskoy Meditsiny. – 2019. – Том 18. – №3. – С.72-80.

5. Брагина, О.Д. Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченых ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu = The development of a highly specific radiochemical compound based on labeled ^{99m}Tc recombinant molecules for targeted imaging of cells with the overexpression of Her-2 / neu / О.Д. Брагина, М.С. Ларькина, Е.С. Стасюк, В.И. Чернов, М.С. Юсубов, В.С. Скуридин, С.М. Деев, Р.В. Зельчан, М.А. Булдаков, **Е.В. Подрезова**, М.В. Белоусов // Бюллетень сибирской медицины = Byulleten Sibirskoy Meditsiny. – 2017. – Т. 16. – №3. – С. 25-33.

Патенты:

1. Патент №2616974 Российской Федерации, МПК (2006.01) C07D 213/38, C07D 213/55. Способ получения ω -(бис(пиридин-2-илметил)амино)алифатических кислот – прекурсоров для связывания металлов / М.С. Юсубов, М.С. Ларькина, **Е.В. Кулибаба (Подрезова)**, Е.С. Стасюк, В.С. Скуридин; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и ФГАОУ ВО НИ Томский политехнический университет. - № 2016101473; заявл. 19.01.2016; опубл. 19.04.2017, Бюл. № 11.

2. Патент №2655392 Российской Федерации, МПК (2006.01) C07K 7/06, C07F 13/00, A61K 51/08, A61K 103/10. Способ получения комплекса технеция- 99m с октреотидом для диагностики нейроэндокринных опухолей / Е.С. Стасюк, Е.А. Нестеров, В.С. Скуридин, М.С. Ларькина, О.Д. Брагина, М.С. Юсубов, Н.В. Варламова, В.Л. Садкин, Е.А. Ильина, А.С. Рогов, **Е.В. Подрезова**, В.И. Чернов, Р.В. Зельчан, М.В. Белоусов, С.В. Кривошеков; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО НИ Томский политехнический университет. - № 2017106820; заявл. 02.03.2017; опубл. 28.05.2018, Бюл. № 16.

3. Патент №2655965 Российской Федерации, МПК (2006.01) G01N 33/534. Способ получения комплекса технеция- 99m с модифицированными специфичными мини-антителами для диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией HER2/neu. М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, М.С. Ларькина, А.М. Гурьев, **Е.В. Подрезова**, В.С. Скуридин, Е.С. Стасюк, В.И. Чернов, О.Д. Брагина, С.М. Деев, Р.В. Зельчан; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, ФГАОУ ВО НИ Томский политехнический университет и ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. - № 2016140287; заявл. 12.10.2016; опубл. 12.05.2018, Бюл. № 15.

4. Патент №2684289 Российской Федерации, МПК (2006.01) A61K 51/04. Способ получения комплекса технеция- 99m с рекомбинантными адресными молекулами белковой природы для радионуклидной диагностики онкологических заболеваний с гиперэкспрессией HER-2/neu / В.И. Чернов, Р.В. Зельчан, А.А. Медведева, О.Д. Брагина, И.Г. Синилкин, В.С. Скуридин, Е.С.

Стасюк, Е.А. Тагирова, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, М.С. Ларькина, **Е.В. Подрезова**; заявитель и патентообладатель ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. - № 2018110029; заявл. 21.03.2018; опубл. 05.04.2019, Бюл. № 10.

5. Патент №2692126 Российской Федерации, МПК (2006.01) C07D 401/12, C07C 275/24, A61K 51/04, A61K 103/10. Способ получения производного мочевины с хелатным центром, тропного к простат-специфичному мембранному антигену для связывания технеция-99м/рения для диагностики/лечения рака предстательной железы / М.С. Ларькина, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, **Е.В. Подрезова**, С.В. Кривошеков, Е.А. Янковская, Р. В. Гурто, А.Г. Мажуга, А.Э. Мачулкин, В.И. Чернов, Р.В. Зельчан, А.А. Медведева, О.Д. Брагина, И.Г. Синилкин; заявитель и патентообладатель ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. - № 2018105277; заявл. 13.02.2018; опубл. 21.06.2019, Бюл. № 8.

6. Патент №2708076 Российской Федерации, МПК (2006.01) C07K 7/06, C07F 13/00, A61K 51/08, A61K 103/10, A61K 38/08, A61P 35/00. Способ получения комплекса технеция-99м с производным октреотида для диагностики нейроэндокринных опухолей / М.С. Ларькина, Е.А. Нестеров, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, Е.С. Стасюк, Н.В. Варламова, В.С. Скуридин, В.Л. Садкин, А.С. Рогов, Е.А. Шелихова, Л.А. Ларионова, **Е.В. Подрезова**, В.И. Чернов, Е.А. Янковская, С.В. Кривошеков; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО НИ Томский политехнический университет. - № 2019128377; заявл. 10.09.2019; опубл. 04.12.2019, Бюл. № 34.

Тезисы докладов на конференции:

1. **Подрезова Е.В.** Разработка способа синтеза прекурсора – производного октреотида для радиофармацевтических препаратов / **Е.В. Подрезова**, В.В. Боденко // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых, Томск, 20-23 Мая 2019. - Томск: ТПУ, 2019. – С. 197-198.

2. **Podrezova E. V.** Cyclic ketones as important precursors for creationing radiopharmaceuticals / **E.V. Podrezova**, M.S. Larkina, M.S. Yusubov, A. V. Ozerskaya // Markovnikov Congress on Organic Chemistry: poster presentation, Kazan, June 21-28, 2019. – Казань: КФУ, 2019. – Р. 188.

3. **Podrezova E. V.** Synthesis of w-Fluoro-substituted of Fatty Acids and their Ethers with the Use of Cyclic Ketone / **E.V. Podrezova**, M.S. Larkina, M.S. Yusubov, A. V. Ozerskaya // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants. MedChem Russia 2019: Abstract book, Ekaterinburg, June 10-14, 2019. - Екатеринбург: Российская Академия наук. Уральское отделение, 2019. – Р. 253.

4. **Подрезова Е.В.** Дизайн хелатирующих агентов для связывания с технецием-99м / **Е.В. Подрезова**, А.О. Артемова, Д. М. Носков, А. Е. Тулупов, М.С. Юсубов // VIII Молодежная конференция ИОХ РАН: сборник тезисов докладов, Москва, 22-23 Мая 2019. - Москва: МАКС Пресс, 2019. – С. 148.

5. **Подrezова Е.В.** Химическая модификация биоразлагаемых микрокапсул для связывания технеция-99м // **Е.В. Подrezова**, М.С. Ларькина // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых, Томск, 21-24 Мая 2018. – Томск: ТПУ, 2018. – С. 538-539.

6. **Подrezова Е.В.** Синтез ω -замещенных жирных кислот и их эфиров с использованием циклических кетонов / **Е.В. Подrezова**, М.С. Ларькина, В.В. Жданкин, М.С. Юсубов // V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии: сборник тезисов, Владикавказ, 10-14 Сентября 2018. - Владикавказ: Профобриздат, 2018. – С. 429.

7. **Подrezова Е.В.** Синтез бис(2-пиридилметил)амино алифатических кислот для получения радиофармацевтических препаратов / **Е.В. Подrezова**, М.С. Ларькина, М.С. Юсубов, О.Д. Брагина, В.И. Чернов, Е.С. Стасюк, В.С. Скуридин // Марковниковские чтения. Органическая химия: от Марковникова до наших дней: сборник тезисов научной конференции, Красновидово, 19-23 Января 2018. - Москва: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2018. – С. 190.

8. **Ларькина М.С.** Новые подходы к созданию таргетных радиофармпрепаратов / М.С. Ларькина, **Е.В. Подrezова**, М.С. Юсубов, О.Д. Брагина, Р.В. Зельчан, В.И. Чернов, Е.С. Стасюк, Е.А. Тагирова, В.С. Скуридин, С.В. Кривошеков, М.В. Белоусов, С.М. Деев // Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ЦНИЛ СибГМУ, Томск, 1-3 Ноября 2017. – Томск: СибГМУ, 2017. – С. 22.

9. **Ларькина М.С.** Разработка радиобиоконъюгата для диагностики в онкологии / М.С. Ларькина, **Е.В. Подrezова**, М.С. Юсубов, В.И. Чернов, Е.С. Стасюк, А.М. Мациевский, В.С. Скуридин // Человек и лекарство: сборник тезисов докладов XXIV Российского национального конгресса, Москва, 10-13 Апреля 2017. – Москва: Видокс, 2017. – С. 102.

10. **Подrezова Е.В.** ω -карбоновые кислоты как прекурсоры для получения радиофармацевтических препаратов / **Е.В. Подrezова**, М.С. Ларькина // Химия и химическое образование: сборник научных трудов VII Международного симпозиума, Владивосток, 17-20 Октября 2017. – Владивосток: ДВФУ, 2017. – С. 32.

11. **Подrezова Е.В.** Окислительное расщепление циклогептанона / **Е.В. Подrezова**, М.С. Ларькина, В.В. Подrezов, А.М. Мациевский // XX Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (с международным участием): тезисы докладов, Нижний Новгород, 18-20 Апреля 2017. – Москва: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2017. – С. 173.

12. **Подrezова Е.В.** Новый синтез ω -замещенных производных разветвленных алифатических карбоновых кислот / **Е.В. Подrezова**, М.С. Ларькина, В.В. Подrezов, А.М. Мациевский // 55-я Международная научная студенческая конференция (МНСК-2017): Химия: материалы конференции, Новосибирск, 17-20 Апреля 2017. - Новосибирск: Изд-во НГУ, 2017. – С. 42.

13. **Подрезова Е.В.** Синтез новых алифатических карбоновых кислот для диагностики в кардиологии / **Е.В. Подрезова**, М.С. Ларькина, В.В. Подрезов, А.М. Мациевский // Менделеев - 2017: сборник тезисов докладов X Международной конференции молодых ученых по химии, Санкт-Петербург, 4-7 Апреля 2017. – Санкт-Петербург: СПбГУ, 2017. – С. 371.

14. **Подрезова Е.В.** Синтез ^{99m}Tc -меченных биоконъюгатов на основе циклических кетонов / **Е.В. Подрезова**, М.С. Ларькина, М.С. Юсубов, О.Д. Брагина, В.И. Чернов, Е.С. Стасюк, В.С. Скуридин // Современные проблемы органической химии: тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения академика А.А. Ворожцова, Новосибирск, 5-9 Июня 2017. – Новосибирск: НИОХ СО АН, 2017. – С. 109

15. **Подрезова Е.В.** Использование некоторых иододержащих органических соединений в качестве прекурсоров для синтеза радиофармацевтических препаратов / **Е.В. Подрезова**, В.В. Подрезов, М.С. Ларькина // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П.Кулева, посвященной 120-летию Томского политехнического университета, Томск, 17-20 Мая 2016. – Томск: ТПУ, 2016. – С. 181-182.

16. **Кулибаба (Подрезова) Е.В.** Синтез метил 6-ди(пиридин-2-илметил)гексаноата как прекурсора для создания центров хелатирования металлов / **Е.В. Кулибаба (Подрезова)** // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 25-29 Мая 2015. – Томск: ТПУ, 2015 - Т. 1. – С. 146-148.

17. **Кулибаба (Подрезова) Е.В.** Синтез метил 6-ди(пиридин-2-илметил)гексаноата как прекурсора для создания центров хелатирования металлов / **Е.В. Кулибаба (Подрезова)**, М.С. Ларькина // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 25-29 Мая 2015. – Томск: ТПУ, 2015 - Т. 1. – С. 146-148.

18. **Kulibaba (Podrezova E.V.)** New syntheses of bis(2-pyridylmethyl)amino acid / **E.V. Kulibaba**, M.S. Larkina, M.S. Yusubov // Mendeleev 2015: Book of Abstracts IX of International Conference of Young Scientists on Chemistry, Saint Petersburg, April 7-10, 2015. – Saint-Petersburg: SPbSU, 2015. – P. 250.