

Методика

© Коллектив авторов, 2024

УДК 578.088.8

Маковеева К.А.¹, Егорова Б.В.^{1,2}, Коков К.В.¹, Артюхов А.А.¹, Кузнецова Т.М.¹, Курочкин А.В.¹, Ершов А.О.³, Касацкий П.С.³, Коневега А.Л.³, Рыбакова А.В.³, Трашков А.П.¹, Колотаев А.В.¹, Осипов В.Н.¹, Хачатрян Д.С.¹, Чувилин Д.Ю.¹, Гончаров Н.Г.¹

Создание радиофармацевтической транспортной конструкции для диагностики и терапии ревматоидных артритов

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия, пл. Академика Курчатова, д. 1;

²ФГБОУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1;

³ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,

188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Россия, мкр. Орлова роща, д. 1

Введение. Проведен синтез конъюгата, состоящего из метотрексата и бифункционального хелатирующего агента. Подобное соединение отличается свойством таргетности по отношению к очагам аутоиммунных артритов. **Цель работы** – синтезировать комплекс, содержащий радионуклид лютеций-177, для терапии аутоиммунных артритов.

Методика. После проведения синтеза радиохимическую чистоту полученного препарата определяли методом тонкослойной хроматографии. В исследованиях *in vivo* в качестве тест-системы были задействованы аутбредные крысы, самцы в количестве 12 особей. Перед началом исследования животные были распределены на контрольную группу и исследуемую по биораспределению. Исследование биораспределения радиоконогата производилось общепринятым способом прямой радиометрии. Оценка производилась путем прямого сравнения распределения радиофармацевтического препарата в крови и органах животных. С учетом периода полураспада радионуклида ¹⁷⁷Lu исследования в контрольных точках при изучении фармакокинетики и биораспределения тестируемых препаратов оценивалось не менее 3 особей животных.

Результаты. Радиохимическая чистота синтезированного препарата составила не менее 95%. Исследования биораспределения показали тенденции к накоплению препарата в ткани почек, сердца, легких, в остальных оцениваемых органах и тканях накопление препарата имело умеренный и транзитный характер. Терапевтический радиофармацевтический препарат продемонстрировал удовлетворительный уровень эффективности в отношении целевой нозологии: отмечалось клинически значимое улучшение и частичное восстановление функций пораженной конечности.

Заключение. Результаты исследования могут быть внедрены в практику научной работы по разработке лекарственных средств и средств медицинского применения и являются основанием для проведения расширенного углубленного исследования и оптимизации механизмов таргетного действия исследуемых в данной работе радиофармацевтических лекарственных препаратов.

Ключевые слова: аутоиммунный артрит; лютеций-177; радиосиноэктомия; таргетная терапия; метотрексат

Для цитирования: Маковеева К.А., Егорова Б.В., Коков К.В., Артюхов А.А., Кузнецова Т.М., Курочкин А.В., Ершов А.О., Касацкий П.С., Коневега А.Л., Рыбакова А.В., Трашков А.П., Колотаев А.В., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С., Чувилин Д.Ю., Гончаров Н.Г. Создание радиофармацевтической транспортной конструкции для диагностики и терапии ревматоидных артритов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 114-125.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.1.114-125

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гончаров Н.Г., Коневега А.Л., Трашков А.П.; сбор и обработка материала – Маковеева К.А., Егорова Б.В., Коков К.В.; проведение биологических исследований – Ершов А.О., Касацкий П.С., Рыбакова А.В.; проведение химических исследований – Колотаев А.В., Осипов В.Н., Хачатрян Д.С.; написание текста – Чувилин Д.Ю., Артюхов А.А., Кузнецова Т.М.; редактирование – Курочкин А.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Коков Константин Владимирович, e-mail: kvkokov@yandex.ru

Финансирование. Работы выполнены при финансовой поддержке Частного учреждения по обеспечению развития атомной отрасли «Наука и инновации» (Росатом) в рамках договора №774/164-D/651/ККФХТ «Создание радиофармацевтической транспортной конструкции на основе аутоиммунных комплексов для диагностики и терапии аутоиммунных артритов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.11.2023

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Makoveeva K.A.¹, Egorova B.V.^{1,2}, Kokov K.V.¹, Artyukhov A.A.¹, Kuznetsova T.M.¹, Kurochkin A.V.¹, Ershov A.O.³, Kasatsky P.S.³, Konevega A.L.³, Rybakova A.V.³, Trashkov A.P.¹, Kolotaev A.V.¹, Osipov V.N.¹, Khachatryan D.S.¹, Chuvilin D.Yu.¹, Goncharov N.G.¹

Synthesis of a radiopharmaceutical for diagnosis and therapy of rheumatoid arthritis

¹National Research Centre Kurchatov Institute,

1 Ploshchad Akademika Kurchatova, Moscow, 123182, Russian Federation;

²Lomonosov Moscow State University,

1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation;

³Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Kurchatov Institute Naional Research Center,

1 Orlova Roshcha, Gatchina Microdistrict, Leningrad Region, 188300, Russian Federation

Background. A conjugate consisting of methotrexate and a bifunctional chelating agent was synthesized. This compound is distinguished by its ability to target foci of autoimmune arthritis.

Aim. To synthesize a radionuclide ¹⁷⁷Lu-based complex for the treatment of autoimmune arthritis.

Methods. After synthesis, the radiochemical purity of the complex was determined by thin layer chromatography. In the *in vivo* study, 12 outbred male rats were used as a test system. Prior to the biodistribution study, the animals were divided into a control group and a study group. The radioconjugate biodistribution was assessed with the generally accepted method of direct radiometry by direct comparison of radiopharmaceutical distribution in blood and organs. Taking into account the ¹⁷⁷Lu half-life, at least three animals were assessed at measurement points when studying the radiopharmaceutical pharmacokinetics and biodistribution.

Results. The radiochemical purity of the ¹⁷⁷Lu-based complex was no less than 95%. Biodistribution studies showed a tendency towards radioactivity accumulation in the kidneys, heart, and lungs. In the remaining assessed organs and tissues, the radioactivity accumulation was moderate and transient. The therapeutic radiopharmaceutical demonstrated a satisfactory effectiveness in relation to the target nosology, autoimmune arthritis, evident as clinically significant improvement and partial restoration of the functions of the affected limb.

Conclusion. The results of the study can be implemented in the practice for the development of drugs and medical devices and justify conducting an expanded study and optimizing the mechanisms for targeted action of the radiopharmaceuticals, such as studied in the present work.

Keywords: autoimmune arthritis; lutetium-177; radiosynovectomy; targeted therapy; methotrexate

For citation: Makoveeva K.A., Egorova B.V., Kokov K.V., Artyukhov A.A., Kuznetsova T.M., Kurochkin A.V., Ershov A.O., Kasatsky P.S., Konevega A.L., Rybakova A.V., Trashkov A.P., Kolotaev A.V., Osipov V.N., Khachatryan D.S., Chuvilin D.Yu., Goncharov N.G. Synthesis of radiopharmaceutical for diagnosis and therapy of rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 114-125. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.1.114-125

Authors' contribution: concept and design of the study – Goncharov N.G., Konevega A.L., Trashkov A.P.; collection and processing of material – Makoveeva K.A., Egorova B.V., Kokov K.V.; biological study – Ershov A.O., Kasatsky P.S., Rybakova A.V.; chemical research – Kolotaev A.V., Osipov V.N., Khachatryan D.S.; writing the text – Chuvilin D.Yu., Artyukhov A.A., Kuznetsova T.M.; editing the text – Kurochkin A.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Konstantin V. Kokov, e-mail: kvkokov@yandex.ru

Financing. This work was carried out with the financial support of the Private Institution for the Development of the Nuclear Industry "Science and Innovation" (Rosatom) under contract No. 774/164-D/651/KKFHT.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Received 17.11.2023

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

Радиосиноэктомия – радиоизотопный метод лечения воспалительных заболеваний суставов с доказанной эффективностью [1]. При введении радиоактивного вещества в сустав происходит воздействие на синовиальную оболочку сустава, что ведет к формированию ее поверхностного фиброза и стойкому подавлению воспаления. Метод является альтернативой хирургической синоэктомии и предназначен для местного лечения практически всех видов хронических синовитов, за исключением инфекционного. Традиционное лечение ревматических заболеваний основано на низких дозах препарата метотрексат – цитостатического препарата из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты [2-4]. Согласно рекомендациям Европейского альянса ассоциаций ревматологов, базисным противовоспалительным препаратом первой линии при этом является метотрексат [5].

Целью проведенных исследований являлась разработка, синтез и исследование препарата для таргетной радионуклидной терапии аутоиммунных (ревматоидных) артритов – конъюгата состава вектор-хелатор-радионуклид. Препарат представляет собой синтетическую конструкцию, состоящую из бифункционального хелатирующего агента (БФХА), конъюгированного с молекулой метотрексата. Посредством присоединенного к аутоиммунному комплексу хелатора DOTA конструкция нагружена β -излучающим радионуклидом ^{177}Lu .

Использование радиоактивно меченных агентов с метотрексатом в качестве инструмента для раннего обнаружения и визуализации воспаления у пациентов с ревматоидным артритом дало многообещающие результаты [6-9]. В этой связи использование метотрексата может найти применение не только в непосредственно диагностических, но и в тераностических подходах. Так, конъюгат, обладающий сродством к фолатным рецепторам на активированных макрофагах, может использоваться для визуализации и адресной терапии аутоиммунного (ревматоидного) артрита. Преимущество такого подхода заключается в том, что метотрексат в конъюгате является не только вектором, доставляющим радионуклид к мишени, но и лекарственным агентом.

Цель исследования – создание перспективного радиофармацевтического таргетного препарата для терапии аутоиммунных артритов, обладающего комбинированным действием веществ на патологический очаг, в результате чего суммарный эффект будет превышать действие, оказываемое на подобный очаг каждым компонентом в отдельности.

Методика

Все реактивы для синтеза получены от Acros Organics, ABCR, Sigma-Aldrich и использовались без дополнительной очистки. Спектры ЯМР регистрировали на Фурье ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III NanoBay 300 МГц (спектры регистрировали в режиме стабилизации по дейтерию, термостабилизация 25°C , внутренний стандарт – тетраметилсилан) в ДМСО- d_6 . Химические сдвиги приведены в миллионных долях (δ), КССВ – в герцах. Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографической системе Agilent LC/MS 1200, с использованием колонки Reprosil – Pur Basic C18 (5 мкм), 4.6×240 мм, подвижная фаза: буфер А – 0.1% TFA в воде, буфер Б – 0.1% TFA в ацетонитриле, элюирование градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 5 до 100% за 20 мин; скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм. Соединения очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на установке, состоящей из двух насосов «GILSON 306» производительностью до 25 мл/мин, манометрического модуля «GILSON 805» и спектрофотометрического детектора UVV-105 («JET chrom»). Разделение проводили на колонке ReproSil-Pur AQ C18 (5 мкм) размером 250×10 мм с предколонкой ReproSil-Pur AQ C18 (10 мкм) размером 30×8 мм. Элюент – водный ацетатно-аммонийный буфер (pH 5)/MeCN (3:2). Масс-спектры ионизации электрораспылением (ИЭР) получены на масс-спектрометре amaZon Bruker Daltonics с ионной ловушкой. Измерение проводилось в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне m/z от 70 до 2200. Напряжение на капилляре распылителя составляло – 4500 В. В качестве газа-носителя использовался азот с температурой 100°C и расходом 6 л/мин. В качестве элюента использовали раствор состава ацетонитрил + ТФУ (0.01%) со скоростью потока 0.3 мл/мин (хроматограф Thermo Scientific UltiMate 3000). Анализируемый образец растворяли в ацетонитриле + ТФУ (0.01%) до концентрации 0.5–1 г/л. Ввод образца в поток производился через автосемплер. Объем вкальваемой пробы 2 мкл. Полноту протекания реакций контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах TLC Silicagel 60 F254, элюент – хлороформ/метанол 3:1.

Для синтеза конъюгата выбран и апробирован метод, в котором метотрексат соединен с бифункциональным хелатирующим агентом DOTA через этилендиаминный линкер EDA – (DOTA-EDA-MTX). На первом этапе проводится синтез промежуточного производного DOTA с этилендиамином ((t-Bu) $_3$ DOTA-EDA (3)) через амидирование метилового или этилово-

го эфира ((t-Bu)₃DOTA-OAlk(2)) [10,11]. Затем проводится синтез целевого соединения по методике, описанной в работе [12]. Общая схема синтеза приведена на **рис. 1**.

На первой стадии процесса получения аминного производного **3** синтезировали DO₃A(tBu)₃ (**1**), после чего проводили реакцию алкилирования полученного **1** этилбромацетатом.

На следующей стадии реакцией аминолитиза (t-Bu)₃DOTA-OEt (**2**) этилендиамином получали соединение **3**.

Взаимодействием MTX с гидроксисукцинимидом с использованием дициклогексилкарбодиимида (DCC)

в качестве конденсирующего агента в диметилформамиде получали активированный сукцинимидный эфир метотрексата, к которому далее без выделения добавляли соединение **3** с получением трет-бутилового эфира конъюгата (t-Bu)₃DOTA-EDA-MTX (соединение **4**).

Трет-бутиловые эфиры удаляли обработкой соединения **4** трифторуксусной кислотой (TFA) с последующей очисткой смеси при помощи препаративной ВЭЖХ. В результате получали конъюгат (DOTA-EDA-MTX) (соединение **5**), который можно использовать для связывания с радионуклидом ¹⁷⁷Lu.

Радионуклид ¹⁷⁷Lu получали «непрямым» методом на исследовательском реакторе ИР-8 НИЦ «Курча-

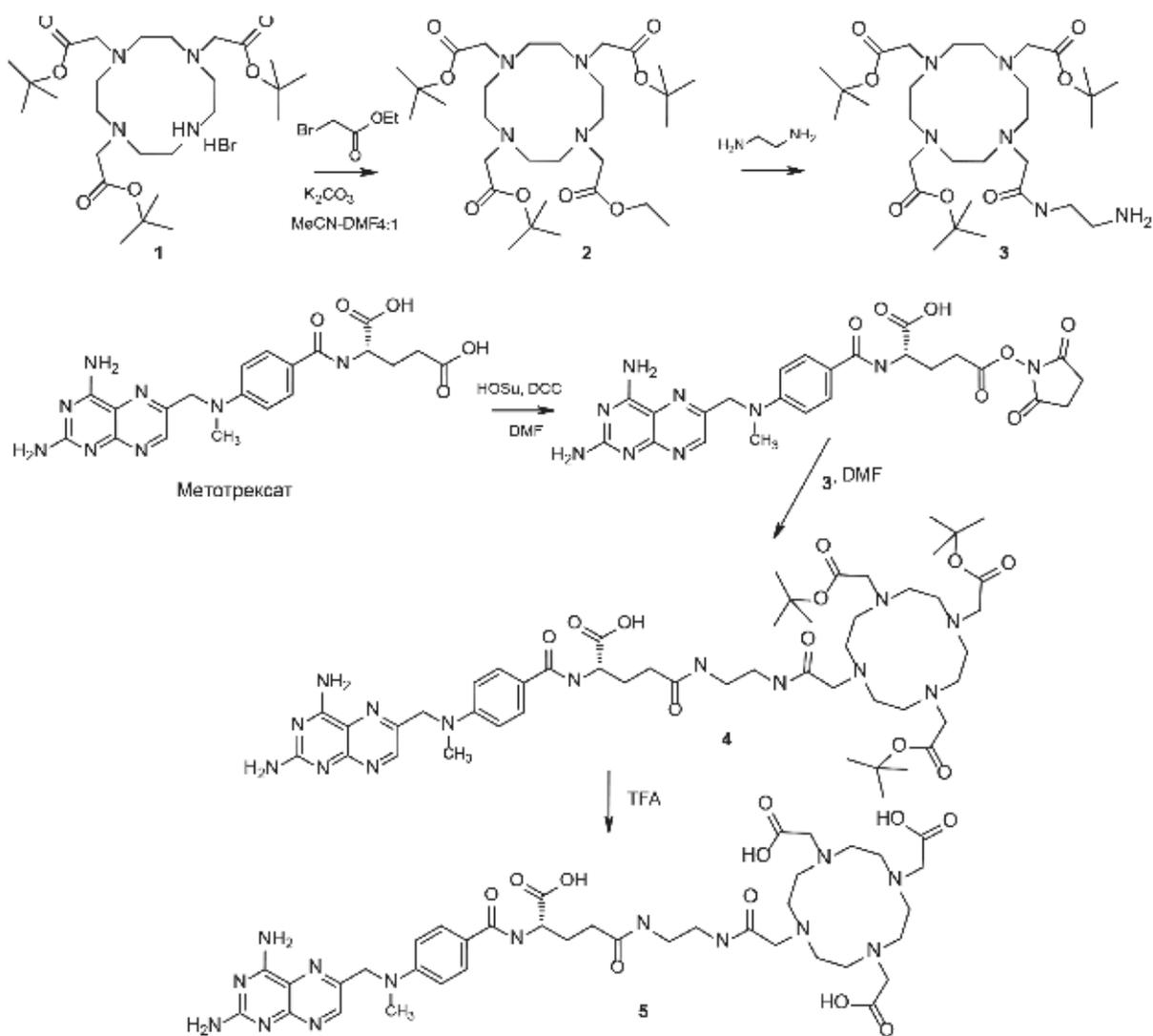


Рис. 1. Схема синтеза конъюгата (DOTA-EDA-MTX).

Fig. 1. Scheme for the (DOTA-EDA-MTX) synthesis.

товский институт» по реакции радиационного захвата $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}\rightarrow^{177}\text{Lu}$ облучением оксида иттербия Yb_2O_3 , обогащенного (99,8%) по изотопу ^{176}Yb , экспозиция 100 ч. На момент окончания облучения активность ^{177}Lu в образце $^{176}\text{Yb}_2\text{O}_3$ массой 111 мг составила $(1,36\pm 0,1) \cdot 10^9$ Бк. Удельная активность ^{177}Lu на момент окончания облучения $\approx 0,33$ мКи/мг. Измерения активности проводили на γ -спектрометре Canberra GL0515R. Для разделения Lu и Yb использована методика, основанная на явлении контактного восстановления (цементации) – электрохимического вытеснения одних металлов другими из их соединений. Детально процесс радиохимического выделения описан в работе [13].

Для синтеза препарата использовался водный раствор конъюгата DOTA-EDA-MTX (4 мг/мл) с молекулярной массой 883 г/моль. Получение $^{177}\text{Lu}[\text{Lu-DOTA-EDA-MTX}]$ проводили в среде 0,15 М CH_3COONa при pH 5,8-6,1. К этой среде, содержащей ^{177}Lu , добавляли препарат так, чтобы концентрация в реакционной смеси составляла значения от 0,01 до 1 ммоль/л. Ввиду хелатирования катиона лигандом DOTA в составе данного конъюгата реакции комплексообразования проводили при 90°C.

Для определения чистоты синтезированного комплекса использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ): элюент – 10% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -MeOH v/v=1/1, неподвижная фаза – SiO_2 на Al. При этих условиях лютеций вне комплекса остается на старте пластины, а комплекс $^{177}\text{Lu}[\text{Lu-DOTA-EDA-MTX}]$ движется с фронтом элюента, поскольку обозначенный элюент используется для анализа комплексов лютеция с олигопептидами [14]. Сканирование пластины после прохождения элюента на предмет гамма-активности позволяет вычислить значение радиохимической чистоты (РХЧ) препарата, представляющее собой отношение активности радионуклида в нужной химической форме (в данном случае в составе терапевтического комплекса) к общей активности радионуклида в образце.

В исследованиях *in vivo* в качестве тест-системы были задействованы аутбредные крысы, самцы в количестве 12 особей. Перед началом исследования животные были распределены на группы: контрольная группа ($n=3$) и $^{177}\text{Lu}[\text{Lu-DOTA-EDA-MTX}]$ ($n=9$).

Адаптация к групповому содержанию в клетках составляла не менее 5 дней. В указанный период у животных ежедневно оценивали общее клиническое состояние путем визуального группового осмотра. Отклонений в клиническом состоянии животных за весь период адаптации не выявлено.

При передаче животных в эксперимент был проведен клинический осмотр партии животных. В экспери-

мент были переданы клинически здоровые животные. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках на подстиле. В каждой клетке находились животные одного вида, получающие один и тот же тестируемый объект. Площадь пола на одно животное соответствовала нормам. В качестве подстилки использовали автоклавированные кукурузные гранулы. Автоклавированный корм для содержания лабораторных животных, приготовленный по ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных».

В экспериментальных исследованиях хронический артрит моделируется введением различных агентов, в том числе введением полного адьюванта Фрейнда. Данная модель широко используется для изучения специфической противовоспалительной активности фармакологических веществ.

Адьювантиндуцированный артрит – это Т-лимфоцитарнозависимый артрит, который включает развитие отека околосуставных тканей, деградацию хряща, потерю функциональной активности сустава, лимфоцитарную инфильтрацию внутрисуставной полости, однако в меньшей степени наблюдается поражение хряща. Первые клинические признаки после введения индуктора патологии наблюдаются уже через 30 мин, а клинические признаки артрита появляются приблизительно через 10 сут после введения адьюванта.

Индуктор патологии, полный адьювант Фрейнда (complete Freund adjuvant (CFA)) производства Sigma Aldrich в объеме 100 мкл вводился крысам в плантарную поверхность правой задней лапы двукратно на 0 и 7-е сут.

Развитие моделируемого патологического процесса протекало без особенностей. Максимальные клинические признаки артрита наблюдались к началу введения тестируемых радиофармацевтических лекарственных препаратов и заключались в выраженном отеке пораженной конечности, покраснении кожных покровов в области поражения с цианотичным оттенком, практически полном отсутствии способности подопытного животного опираться на конечность.

Ежедневно до момента формирования групп лечения проводился индивидуальный клинический осмотр животных, с целью оценки следующих показателей: выраженность отека, степень покраснения лапы и оценка двигательной активности.

Формирование экспериментальных групп осуществлялось при помощи метода модифицированной блоч-

ной рандомизации. Так как реакция организма на моделирующий агент наблюдалась в 100% случаях, в рандомизации участвовали все животные. Для этого всех животных случайным образом помещали в ячейки блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел, получали перечень данных, содержащий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда в дальнейшем были размещены животные.

По окончании эксперимента крысы подвергались эвтаназии. Все эвтаназированные животные были подвергнуты процедуре некропсии, включающей внешний осмотр, осмотр места введения исследуемых объектов, всех отверстий, полостей тела и их содержимого, получение биологического материала для прямой радиометрии.

Исследование биораспределения конъюгата [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX производилось общепринятым способом прямой радиометрии с использованием сертифицированного и поверенного оборудования (жидкостной сцинтилляционный счетчик Tri-Carb 2100TR). Исследуемый препарат разводили в изотоническом растворе, после чего следовало добавление немеченого метотрексата для повышения концентрации. Итого, объем одной инъекции составлял 300 мкл, в котором содержалось 5 МБк [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX (концентрация метотрексата 1,78 ммоль/л), введение в крысу осуществлялось через хвостовую вену. Оценка производилась путем прямого сравнения распре-

деления радиофармацевтического препарата в крови и органах животных. С учетом периода полураспада радионуклида ^{177}Lu исследования в контрольных точках при изучении фармакокинетики и биораспределения тестируемых препаратов оценивалось не менее 3 особей животных.

Взятие биологического материала производилось в условиях общего наркоза (инъекционный золотиловый наркоз, внутримышечно) при полной аутопсии животного. После окончания процедуры взятия крови животное подвергалось эвтаназии. Органы и ткани были взвешены и размещены в стерильных пробирках и подвергнуты радиологическому анализу.

Статистическая обработка производилась при помощи пакета программ SPSS for Windows. Проверка характера распределения данных производилась расчетом критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок производилось при помощи U-критерия Манна–Уитни (при распределении вариант в выборочной совокупности, отличном от нормального). Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$), что является стандартом в медико-биологических исследованиях.

Результаты и обсуждение

Результаты синтеза [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX представлены на **рис. 2**. Видно, что после 20 мин синтеза значительного изменения в радиохимической чистоте не наблюдается. Кроме того, при 0,1 мМ содержания лиганда более 95% радионуклида связано

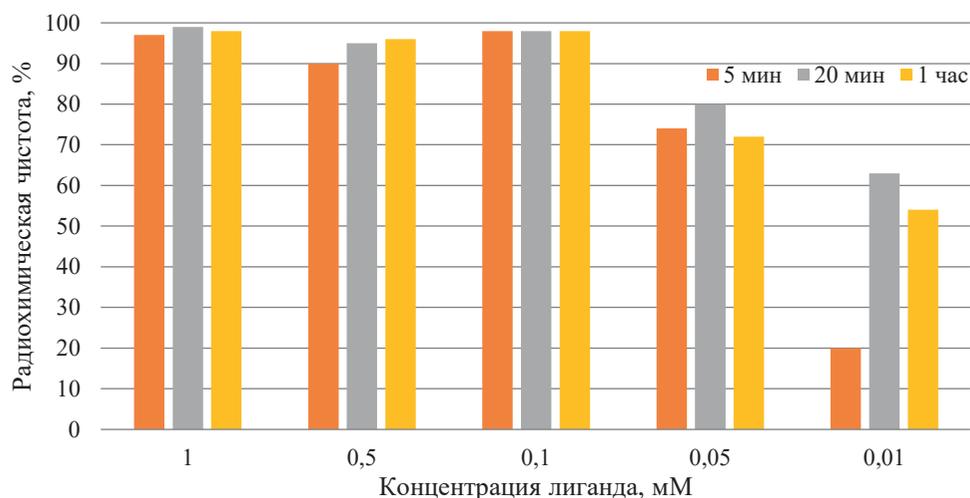


Рис 2. Радиохимическая чистота получаемого меченого комплекса [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в зависимости от концентрации лиганда и времени синтеза.

Fig. 2. Radiochemical purity of the [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX complex depending on the ligand concentration. and synthesis time.

уже через 5 мин. Кинетическую устойчивость конъюгата определяли по РХЧ препарата после выдержки при температуре 37°C в растворе 0,9% NaCl или эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС) (HyClone Laboratories) в течение 2 сут. Для изучения диссоциации в среде сывороточных белков образец разбавляли сывороткой в 10 раз: $v([^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOТА-ЕDА-MТХ})/v(\text{ЭТС})=1/9$. Через определённые интервалы времени отбирали 90 мкл образца, денатурировали спиртом $v=270$ мкл, охлаждали при 4°C для более эффективного осаждения белков и центрифугировали

при 5000 об/мин в течение 5 мин. Затем отделяли маточный раствор, измеряли на гамма-спектрометре его активность и рассчитывали долю активности, не связанную с белками сыворотки. Устойчивость в изотоническом растворе определяли методом тонкослойной хроматографии. Результаты представлены в **таблице**.

Видно, что в течение 2-х сут инкубирования доля радионуклида, связанного в комплекс, практически не меняется, что говорит об устойчивости данного соединения в этих средах.

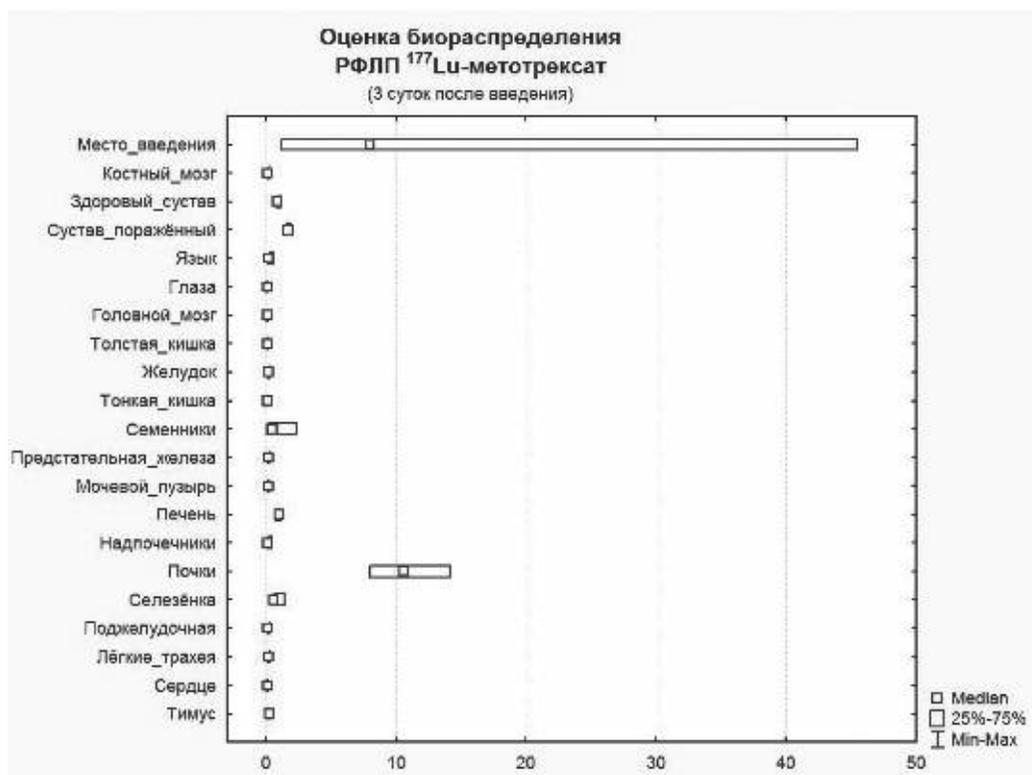


Рис. 3. Оценка биораспределения $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOТА-ЕDА-MТХ}$ в органах крысы с аутоиммунным артритом (контрольная точка 3 сут). По оси X – доля активности в органе от общей введенной активности, деленная на массу органа (%ID / г). Данные приведены в виде Me (QQ) (медиана и квантили) и 95% доверительного интервала.

Fig. 3. Assessment of the biodistribution of $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOТА-ЕDА-MТХ}$ in the organs of rats with autoimmune arthritis (control point 3 days). The X axis is the proportion of activity in the organ from the total administered activity, divided by the mass of the organ (%ID / g). Data are presented as Me (QQ) (median and quartiles) and 95% confidence interval.

**Устойчивость $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOТА-ЕDА-MТХ}$ в средах
Stability of $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOТА-ЕDА-MТХ}$ in media**

Среда Medium	15 мин 15 min	30 мин 30 min	1 ч 1 hour	3 ч 3 hours	1 сут 1 day	2 сут 2 days
0,9% NaCl	-	-	95±3%	-	98±1%	95±4%
ЭТС FBS	92±6%	85±6%	94±5%	92±3%	93±6%	93±5%

Активность препарата, вводимая животному, составляла 5 МБк. Было проведено обследование крыс в 3 контрольных точках (3-7-15 сут). Сравнительные результаты прямой радиометрии, указывающей на кинетические характеристики и распределение исследуемого препарата [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в организме животного с трансплантированной опухолью приведены на рисунках 3-5. При анализе результатов прямой радиометрии отмечены тенденции к накоплению препарата в нецелевых для терапии органах: ткани почек, сердца, легких. В остальных оцениваемых органах и тканях накопление препарата имело умеренный и, большей частью, транзитный характер или практически не происходило.

При этом отмечается накопление препарата в целевом очаге (пораженный сустав), а именно, доля активности в целевом органе с течением времени увеличивается, уступая лишь обозначенным нецелевым органам с тенденцией накопления препарата.

Через 48 ч после терапии экспериментального аутоиммунного артрита тестируемым препаратом наблюдалось значительное клиническое улучшение (уменьшение отека пораженной конечности, практически полное восстановление окраски покровных тканей) по сравнению с контрольной группой. Через 72 ч после начала лечения все животные из группы введения [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX частично восстановили возможность опираться на пораженную конечность при ходьбе в отличие от контрольной группы.

Заключение

Синтезировано соединение [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX, оптимизированы условия комплексообразования в зависимости концентрации лиганда и продолжительности синтеза.

Проведены исследования устойчивости конъюгата [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в биологических средах – эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС)

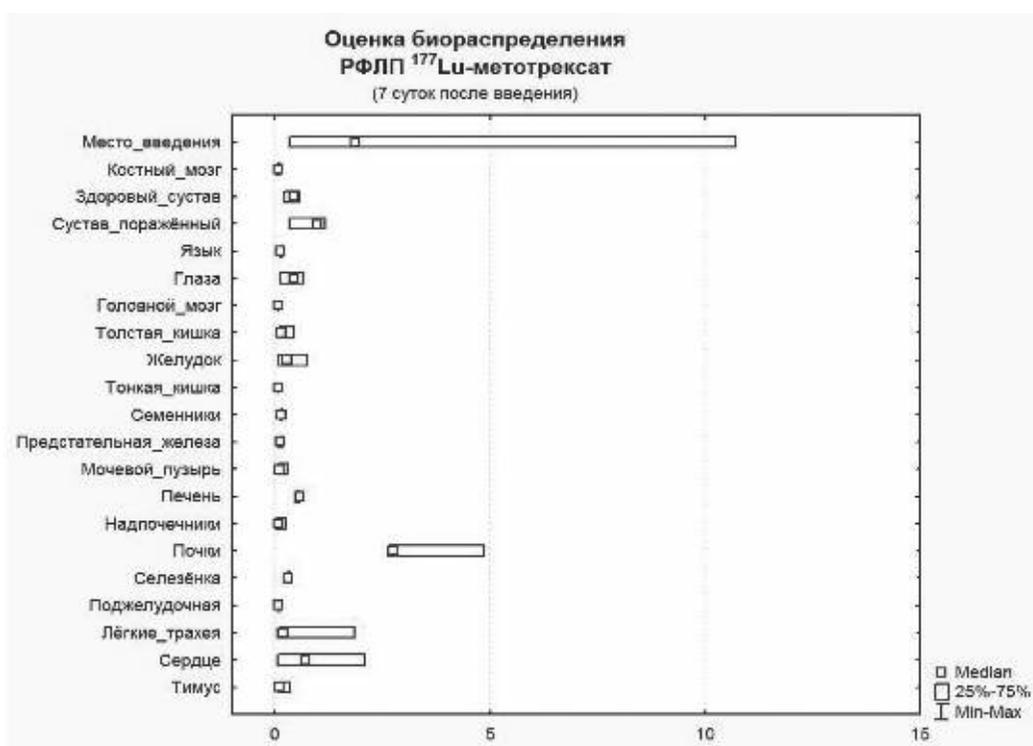


Рис. 4. Оценка биораспределения [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX в органах крысы с аутоиммунным артритом (контрольная точка 7 сут). По оси X – доля активности в органе от общей введенной активности, деленная на массу органа (%ID / г). Данные приведены в виде Me (QQ) (медиана и квантили) и 95% доверительного интервала.

Fig. 4. Assessment of the biodistribution of [^{177}Lu]Lu-DOTA-EDA-MTX in the organs of rats with autoimmune arthritis (control point 7 days). The X axis is the proportion of activity in the organ from the total administered activity, divided by the mass of the organ (%ID / g). Data are presented as Me (QQ) (median and quartiles) and 95% confidence interval.

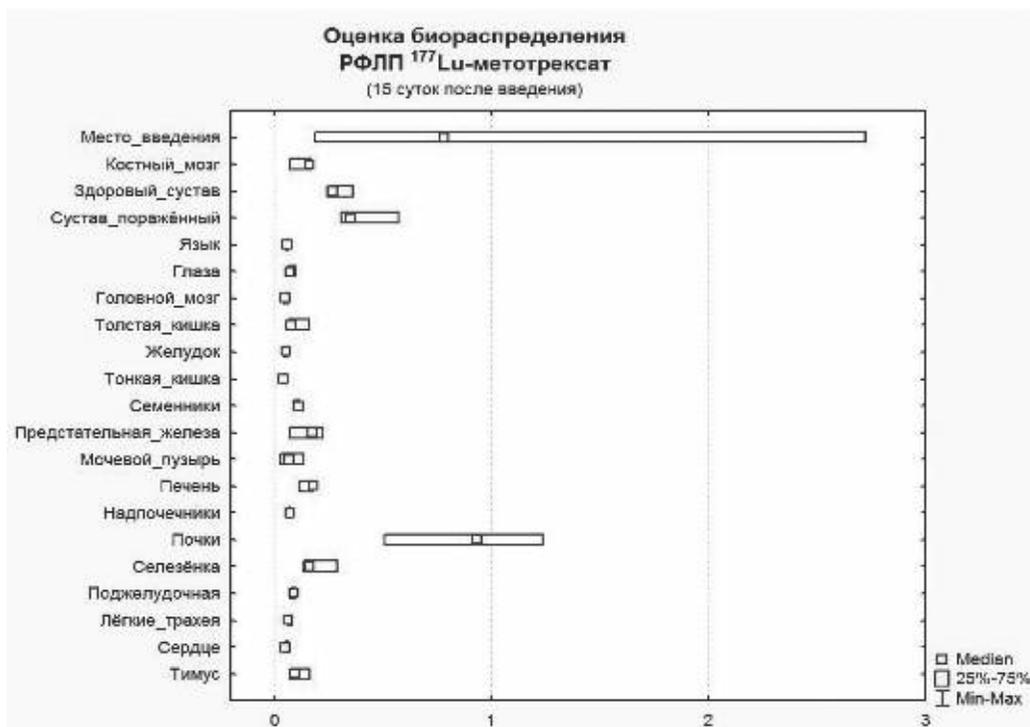


Рис. 5. Оценка биораспределения $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}^{\text{TA}}\text{-ED}^{\text{A}}\text{-MTX}$ в органах крысы с аутоиммунным артритом (контрольная точка 15 сут). По оси X – доля активности в органе от общей введенной активности, деленная на массу органа (%ID / г). Данные приведены в виде Me (QQ) (медиана и квантили) и 95% доверительного интервала.

Fig. 5. Assessment of the biodistribution of $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}^{\text{TA}}\text{-ED}^{\text{A}}\text{-MTX}$ in the organs of rats with autoimmune arthritis (control point 15 days). The X axis is the proportion of activity in the organ from the total administered activity, divided by the mass of the organ (%ID / g). Data are presented as Me (QQ) (median and quartiles) and 95% confidence interval.

и изотоническом растворе (0,9% NaCl). Устойчивость в растворе NaCl составила >95%, а в сыворотке ЭТС >85%.

Проведены исследования *in vivo* на лабораторных животных после внедрения ревматоидного артрита. Через 48 часов после начала терапии наблюдалось значительное клиническое улучшение, через 72 ч все животные этой группы частично восстановили возможность опираться на пораженную конечность при ходьбе. Препарат $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DO}^{\text{TA}}\text{-ED}^{\text{A}}\text{-MTX}$ продемонстрировал удовлетворительный уровень эффективности в отношении целевой нозологии: отмечалось клинически значимое улучшение и частичное восстановление функций пораженной конечности.

Результаты исследования могут быть внедрены в практику научной работы по разработке лекарственных средств и средств медицинского применения и являются основанием для проведения расширенного углубленного исследования и оптимизации механиз-

мов таргетного действия исследуемых в данной работе радиофармацевтических лекарственных препаратов.

Литература (пп. 3-4; 6-14 см. References)

1. Зверев А.В., Крылов В.В., Ханов А.Г., Кочетова Т.Ю. Радиосиноэктомия – метод лечения воспалительных заболеваний суставов с помощью изотопов. *Медицинское обозрение*. 2017; (1): 36–41.
2. Насонов Е.Л. *Противовоспалительная терапия ревматических болезней*. М.: М-Сити; 1996.
5. Насонов Е.Л., Амирджанова В.Н., Олюнин Ю.А. и др. Применение метотрексата при ревматоидном артрите. Рекомендации Общероссийской общественной организации «Ассоциация ревматологов России». *Научно-практическая ревматология*. 2023; 61(4): 435–49.

References

1. Zverev A.V., Krylov V.V., Khanov A.G., et al. Radiosynovectomy is a method of treating inflammatory joint diseases using isotopes. *Meditsinskoe obozrenie*. 2017; (1): 36–41. (in Russian)

2. Nasonov E.L. *Anti-Inflammatory Therapy of Rheumatic Diseases [Protivovospalitel'naya terapiya revmaticheskikh bolezney]*. Moscow; M-City; 1996. (in Russian)
3. Alarcon G.S. *Methotrexate: Its use for the treatment of rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders*. In: Ed. W.J. Koopman. Arthritis and Allied Conditions. A Text Book of Rheumatology, 13th Edition. London; Williams & Wilkins Baltimore; 1997.
4. Papachristou M., Kastis G.A., Stavrou P.Z., Xanthopoulos S., Furenlid L.R., Datsaris I.E., et al. Radiolabeled methotrexate as a diagnostic agent of inflammatory target sites: A proof-of-concept study. *Mol Med Rep*. 2018; 17: 2442-8.
5. Nasonov E.L., Amirdzhanova V.N., Olyunin Yu.A. et al. The use of methotrexate in rheumatoid arthritis. Recommendations of the All-Russian public organization "Association of Rheumatologists of Russia". *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2023; 61(4): 435-49.
6. Rasheed R., Gilani J., Jielani A., Irum F., Lodhi N., Rasheed S., et al. Tc99m Methotrexate (MTX): A Novel Complex for Imaging of Rheumatoid Arthritis (RA): First Clinical Trials. 2015. <https://www.iomcworld.com/open-access/tc99m-methotrexate-mtx-a-novel-complex-for-imaging-of-rheumatoidarthritis-ra-first-clinical-trials-2157-7145-1000S2003.pdf> (Accessed 13.10.2023).
7. Boss S.D., Ametamey S.M. Development of Folate Receptor-Targeted PET Radiopharmaceuticals for Tumor Imaging – A Bench-to-Bedside. *Journey. Cancers*. 2020; 12: 1508-29.
8. Verweij N.J.F., Yaqub M., Bruijnen S.T.G. et al. First in man study of [¹⁸F] fluoro-PEG-folate PET: a novel macrophage imaging technique to visualize rheumatoid arthritis. *Sci Rep*. 2020; 10: 1047.
9. El-Safoury D.M., Ahmed Badr Ibrahim, El-Setouhy D.A., Khowessah O.M., Motaleb M.A., Tamer M. Sakr. Amelioration of Tumor Targeting and In Vivo Biodistribution of ^{99m}Tc-Methotrexate-Gold Nanoparticles (^{99m}Tc-Mex-AuNPs). *J Pharm Sci*. 2021; 110: 2955-65.
10. Stetter H., Wolfram F. Complex Formation with Tetraazacycloalkane-N,N',N'',N''';-tetraacetic Acids as a Function of Ring Size. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1976; 15(11): 686.
11. Moi Min K., Claude F. Meares, Sally J. DeNardo. The peptide way to macrocyclic bifunctional chelating agents: synthesis of 2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid and study of its yttrium(III) complex. *Journal of the American Chemical Society*. 1988; 110 (18): 6266-7.
12. Volkert Wynn A., Timothy J. Hoffman. Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Chemical Reviews*. 1999; 99 (9): 2269-92.
13. Makoveeva K.A., Artyukhov A.A., Egorova B.V., et al. On an Efficient Method for Obtaining the Medical Radionuclide ¹⁷⁷Lu and Therapeutic Compounds Based on It. *Nanobiotechnology Reports*. 2023; 18(4): 610-6.
14. Kraihammer M., Garnuszek P., Bauman A., et al. Improved quality control of [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T. *EJNMMI Radiopharm. Chem*. 2023; 8(7).

Сведения об авторах:

Маковеева Ксения Александровна, науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Егорова Байирта Владимировна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НИЦ «Курчатовский институт»; ФГБОУ «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

Коков Константин Владимирович, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Артюхов Алексей Александрович, канд. хим. наук, нач. лаб., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Кузнецова Татьяна Михайловна, науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Курочкин Александр Вячеславович, науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Еришов А.О., ветеринарный врач, ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Касацкий Павел Сергеевич, мл. науч. сотр., ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Конева Андрей Леонидович, канд. ф.-м. н., рук. отделения, ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Рыбакова А.В., науч. сотр., ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Трашков Александр Петрович, к. м. н., ам. руководителя Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий по научной работе ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»; ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

Колотаев Антон Владимирович, к. х. н., ст. науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Осипов Василий Николаевич, к. х. н., ст. науч. сотр., ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Хачатрян Дереник Саркисович, к. х. н., нач. лаб. ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Чувилин Дмитрий Юрьевич, д. ф.-м. н., зав. отд.-нием, ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»;

Гончаров Николай Гаврилович, д. м. н., помощник президента по медико-биологическим исследованиям ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт».

Приложение 1

Методика определения чистоты конъюгата

Определение содержания основного вещества в исследуемом образце проводится методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряжённой с масс-спектрометрией (методом LC/MS).

Содержание основного вещества и идентификацию по молекулярному иону $[M+H]^+$ определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим. Испытания проводили в соответствии с методикой,

Приготовление элюента А (вода с 0,01% ТФУК)

В стакан объёмом 3 л наливают 2 л деионизированной воды и добавляют 200 мкл трифторуксусной кислоты (ТФУК), после чего перемешивают на магнитной мешалке при скорости 400 об/мин в течение 3 мин. После этого элюент отфильтровывают через фильтр с порами 0,45 мкм и переливают в чистую стеклянную ёмкость для элюента А.

Приготовление элюента В (ацетонитрил с 0,01% ТФУК)

В стакан объёмом 3 л наливают 2 л ацетонитрила для хроматографии и добавляют 200 мкл ТФУК, после чего перемешивают на магнитной мешалке при скорости 400 об/мин в течение 3 мин. После этого переливают элюент в чистую стеклянную ёмкость для элюента В.

Приготовление раствора для растворения образцов (вода – ацетонитрил – ТФУК 500:500:1).

В стакан объёмом 200 мл наливают 50 мл деионизированной воды и 50 мл ацетонитрила для хроматографии, добавляют 100 мкл ТФУК, после чего перемешивают на магнитной мешалке при скорости 400 оборотов в минуту в течение 3 мин. После этого переливают раствор в чистую стеклянную ёмкость.

Приготовление раствора образца для анализа

На аналитических весах (с точностью 0,1 мг) непосредственно в таре для растворения взвешивают навеску 1 мг образца. Добавляют 2 мл раствора для растворения образцов и выдерживают в ультразвуковой бане в течение 60–120 с до полного растворения. Если в растворе остаются твёрдые включения или муть, то жидкость подвергают центрифугированию в течение 2 мин при 13 000 об/мин на настольной центрифуге. После этого 400 мкл полученного раствора переносят в виал. Виал помещают в автосемплер хроматографической системы Agilent LC/MS 1200.

Проведение LC/MS анализа

Подготовка прибора и проведение анализа производится по инструкции, прилагаемой к прибору.

Колонку перед анализом уравнивают подвижной фазой имеющую состав: 95% элюента А и 5% элюента В, скорость потока 1 мл/мин, до получения стабильной базовой линии (примерно 10 мин). После этого производят анализ образца.

Параметры анализа:

- колонка – ReproSil-Pur Basic C18 5 мкм размером 250×4,6 мм с предколонкой SecurityGuard Cartridges Widedpore C18 4×2 мм;
- объём вводимого раствора образца – 2 мкл;
- скорость потока 1 мл/мин;
- используется градиентная подача элюента по схеме от смеси элюентов 95% А + 5% В до 100% В за 20 мин, затем изократическая подача 100% В в течение 2 мин;
- детектирование на УФ-детекторе с длиной волны 220 нм.

Содержание основного вещества в образце определяется относительной величиной площади пика на хроматограмме.

Спектры ESI-MS регистрируются на MS детекторе Agilent Ion Trap 6310. Ионизация пробы с помощью электроспрея, регистрация в режиме положительных ионов, в некоторых случаях в режиме отрицательных ионов.

Настройки масс-детектора:

- давление на нибулайзере 40 psi;
- напряжение на нибулайзере 3500 вольт;
- поток шторного газа 7 л в мин;
- температура газа носителя 360°C;
- детекция масс в диапазоне от 70 до 1500 атомных единиц массы.

Параметром, характеризующим анализируемое вещество, является молекулярный вес иона, определённый МС детектором.

Испытуемый образец растворяли и анализировали в соответствии с описанной методикой с использованием хроматографической системы Agilent 1290 Infinity LC, оснащённой спектрофотометрическим детектором.

Для идентификации по молекулярному иону испытуемый образец анализировали с использованием хроматографической системы Agilent LC/MS 1290, оснащённой масс-спектрометрическим детектором Agilent Ion Trap 6310.

Методика очистки

Раствор конъюгата в 1 мл ацетонитрила вводят в один приём через шприц Луер-лок в систему препаративного хроматографа Pure C-815 Flash, снабженного колонкой FP ECOFLEX C18 80g (скорость потока 55 мл/мин). Используют градиент ацетонитрил – вода (%): от 5 – 95 до 20 – 80 (18 мин), от 20 – 80 до 40 – 60 (15 мин), от 40 – 60 до 50 – 50 (20 мин), от 50-50 до 95 – 5 (10 мин), 95 – 5 (5 мин). Фракции собирают в пробирки в коллекторе фракций. Фракции, содержащие целевой продукт объединяют. Объединённые фракции с целевым продуктом упаривают на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса при 40 °С.

Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы

Фурье-спектрометр ЯМР Bruker Avance III Nanobay 300 МГц с рабочей частотой магнитного поля 300.13 МГц на ядрах ^1H и программным обеспечением для сбора, обработки и анализа данных ЯМР.

Весы лабораторные высокого класса точности по ГОСТ Р 53228-2008.

Ампулы стеклянные для ЯМР-спектроскопии с крышками.

Дозатор пипеточный (пипетка одноканальная) переменного объема вместимостью (200-1000) мм³ с допустимой относительной погрешностью не более 2 %.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556-81.

Хлороформ дейтерированный для ЯМР с изотопным содержанием атомов дейтерия 99,9 %, CAS 865-49-6.

Диметилсульфоксид дейтерированный для ЯМР с изотопным содержанием атомов дейтерия 99,9 %, CAS 2206-27-1.

Дейтерийоксид для ЯМР с изотопным содержанием атомов дейтерия 99,9 %, CAS 7789-20-0.

Проведение анализа ЯМР

Около 0,01 г анализируемого образца взвешивают в ампуле, приливают 300 мм³ дейтерированного растворителя. Ампулы с готовыми растворами тщательно встряхивают и протирают ватой для удаления возможных загрязнений. Спектры растворов анализируемых соединений записывают в режиме термостабилизации при 25°С в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

^1H ЯМР (DMSO-*d*6) δ 8.58 (с, 1H), 7.74 (д, $J=8.4$ Гц, 2H, HetAr), 6.68 (д, $J=8.5$ Гц, 2H, HetAr), 4.80 (с, 2H), 4.28 (ш. с, 1H), 3.91 – 2.08 (м, 24H, NCH₂), 1.53 – 1.38 (м, 27H, *t*-Bu), 1.27 – 0.96 (м, 4H, CH₂).