

Разработка способа получения производного октреотида для диагностики нейроэндокринных опухолей

Ларькина М.С.¹, Подрезова Е.В.², Брагина О.Д.³, Тагирова Е.А.², Чернов В.И.³, Юсубов М.С.², Нестеров Е.А.², Скуридин В.С.², Кривошеков С.В.^{1,2}, Яновская Е.А.⁴, Гурто Р.В.⁴, Белоусов М.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

³ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

⁴ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФирМ) им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

РЕЗЮМЕ

Введение. В настоящее время разработка технологии меченых аналогов соматостатина технецием-99м (^{99m}Tc) для радионуклидной диагностики нейроэндокринных опухолей активно проводится по всему миру. Аналоги соматостатина, к которым относится октреотид, связываются с ^{99m}Tc только путем предварительного присоединения к ним хелатирующего агента. Поэтому актуальным является модификация октреотида прекурсорами с высокой хелатирующей способностью для прочного связывания ^{99m}Tc. В качестве таких прекурсоров успешно могут применяться ω-бис(пиридин-2-илметил)амино)алифатические кислоты.

Цель исследования. Разработка способа получения нового производного октреотида, пригодного для диагностики нейроэндокринных опухолей.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали октреотид – аналог соматостатина. В качестве бифункционального хелатирующего агента использовали сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноат, синтезированный по модифицированной методике с учетом специфики агента. Для разделения и анализа синтезированных соединений применяли методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

Результаты исследования. Предложен способ получения производного октреотида с применением хелатирующего агента сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноата в среде 10 ммоль PBS (рН = 6,0) с добавлением 20%-го ацетонитрила в течение 24 ч. Разработаны условия для анализа и очистки активного производного октреотида с использованием аналитической и полупрепаративной жидкостной хроматографии.

Заключение. Впервые в результате модификации октреотида по остатку D-фенилаланина создан центр хелатирования для технеция-99м на основе ω-бис(пиридин-2-илметил)амино)алифатических кислот. Производное октреотида является перспективным для дальнейшего изучения его функциональной пригодности для диагностики нейроэндокринных опухолей.

Ключевые слова: октреотид, технеций-99м, хелатирующий агент, соматостатиновые рецепторы, нейроэндокринные опухоли, ОФЭКТ.

✉ Ларькина Мария Сергеевна, e-mail: marialarkina@mail.ru.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Государственный контракт № 14.N08.11.0166 от 14.09.2017).

Для цитирования: Ларькина М.С., Подрезова Е.В., Брагина О.Д., Тагирова Е.А., Чернов В.И., Юсубов М.С., Нестеров Е.А., Скуридин В.С., Кривошеков С.В., Яновская Е.А., Гурто Р.В., Белоусов М.В. Разработка способа получения производного октреотида для диагностики нейроэндокринных опухолей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (3): 72–80. [https://doi.org: 10.20538/1682-0363-2019-3-72-80](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-72-80).

УДК 616-006.48-07:577.171.7

[https://doi.org: 10.20538/1682-0363-2019-3-72-80](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-72-80)

Development of a method for preparing octreotide derivative for diagnosis of neuroendocrine tumors

Larkina M.S.¹, Podrezova E.V.², Bragina O.D.³, Tagirova E.A.², Chernov V.I.³, Yusubov M.S.², Nesterov E.A.², Skuridin V.S.², Krivoshchekov S.V.^{1,2}, Yanovskaya E.A.⁴, Gurto R.V.⁴, Belousov M.V.¹

¹ Siberian State Medical University (SSMU)

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)

30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Science

5, Kooperativnyi Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

⁴ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPhRM), Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Science

3, Lenina Av., Tomsk, 634028, Russian Federation

ABSTRACT

Currently the development of technologies for labeling somatostatin with technetium-99m for diagnosing radionuclide neuroendocrine tumors is under way. Somatostatin analogues are binded with technetium-99m only by the preliminary addition of a chelating agent. Therefore, it is important to develop a method for preparation of an octreotide derivative by modifying octreotide with precursors: ligands with high chelating ability for its tight binding with technetium-99m. ω-Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)aliphatic acids can be used successfully as such precursors.

The purpose of the study was to develop a method for obtaining a new octreotide derivative for diagnosing neuroendocrine tumors.

Materials and methods. The somatostatin octreotide analogue was used as the object of the study; succinimid-1-yl 6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexanoate was used as a chelating agent. Methods of high performance liquid chromatography and mass spectrometry were used to separate and analyze the synthesized compounds.

Results. A method to produce an original octreotide derivative using a succinimid-1-yl 6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexanoate as a chelating agent was proposed. The conditions of analytical and semi-preparative HPLC for the analysis and purification of the active octreotide derivative (a monosubstituted derivative of the amino acid residue of D-phenylalanine) were suggested.

Conclusion. The synthesized derivative of octreotide has a chelating center for strong binding to technetium-99m in its structure, which can be useful for diagnosing neuroendocrine tumors.

Key words: octreotide, technetium-99m, chelating agent, somatostatin receptors, neuroendocrine tumors, SPECT.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the federal target program “Development of the pharmaceutical and medical industries in the Russian Federation up to 2020 and further” (State contract No. 14.N08.11.0166 of 14.09.2017).

For citation: Larkina M.S., Podrezova E.V., Bragina O.D., Tagirova E.A., Chernov V.I., Yusu-bov M.S., Nesterov E.A., Skuridin V.S., Krivoshechekov S.V., Yanovskaya E.A., Gurto R.V., Belousov M.V. Development of a method for preparing octreotide derivative for diagnosis of neuroendocrine tumors. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (3): 72–80. [https://doi.org: 10.20538/1682-0363-2019-3-72-80](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-72-80).

ВВЕДЕНИЕ

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) – группа новообразований, происходящих из клеток нейроэндокринной системы, способных продуцировать пептидные гормоны и биогенные амины [1]. Нейроэндокринные опухоли относятся к числу редко встречающихся онкологических заболеваний: статистические показатели заболеваемости составляют 2–3 человека на 100 тыс. населения. Однако специалисты указывают на то, что при аутопсии НЭО обнаруживаются у 10 человек на 100 тыс. населения, что свидетельствует о низком уровне прижизненной диагностики [2]. Следует отметить, что у более 70% пациентов с НЭО тонкой кишки и у 30–80% – поджелудочной железы диагноз ставится уже на стадии метастатического поражения печени [3].

Диагноз НЭО обычно ставится на основании клинической симптоматики, данных гистологического и иммуногистохимического исследований с оценкой гормональной экспрессии. К сожалению, использование традиционных диагностических методов не всегда в полной мере позволяет оценить распространенность опухолевого процесса, что обуславливает необходимость создания новых диагностических агентов. В последние годы активно развиваются радиоизотопные методы для выявления специфических опухолевых мишеней с применением радиоизотопов [4–7].

В настоящее время в качестве перспективных адресных молекул в онкологии изучаются низкомолекулярные пептиды, имеющие сродство с рецепторами опухолевых клеток. Одними из наиболее изученных и часто упоминаемых в литературе являются синтетические пептиды, производные

соматостатина, применяемые для диагностики и лечения НЭО [8]. Молекулярными предпосылками для разработки и клинического применения, направленными на соматостатиновые рецепторыsstr-препаратов на основе меченных радиоизотопами производных соматостатина, является высокий уровень экспрессии этих рецепторов на поверхности опухолевой клетки [9].

Метод визуализацииsstr-позитивных опухолей человека впервые был применен с использованием соматостатинового аналога [¹²³I-Тур³]октреотида, имеющего избыточное накопление в печени, желчном пузыре, желчных протоках и т.п. Наиболее распространенным соматостатиновым аналогом, использующимся для скинтиграфии в настоящее время, является ¹¹¹In-пентетреотид (¹¹¹In-DTPA-D-Phe-октреотид, Octreoscan, Mallinckrodt Int., Великобритания), являющийся золотым стандартом для выявления соматостатиновых рецепторов (sstr2, sstr3, sstr5) на поверхности опухолевых клеток основного опухолевого узла и метастатических очагов. В России применяется только ¹¹¹In-октреотид (АО «Фарм-синтез»), являющийся аналогом ¹¹¹In-пентетреотид. Однако, входящий в их состав радионуклид индий-111 (¹¹¹In) имеет очень высокую стоимость и длительный период полураспада (67 ч), что ограничивает применение препарата для рутинной диагностики НЭО [10, 11].

Кроме того, за рубежом зарегистрированы и активно разрабатываются различные радиофармпрепараты (РФП) на основе аналогов соматостатина для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и радионуклидной терапии (таблица) [12–17].

Характеристика радиофармпрепаратов на основе аналогов соматостатина для радионуклидной диагностики и терапии нейроэндокринной опухоли
 Characteristics of radiopharmaceuticals based on somatostatin analogues for radionuclide diagnosis and treatment of neuroendocrine tumors

Радиофармпрепарат Radiopharmaceutical	Радионуклид Radionuclide	Период полураспада / тип распада Half-life period / type of decay	Область применения Area of application
¹⁸ F-FP-Gluc-TOCA Cel-S-Dpr([¹⁸ F]FBOA)TOCA	¹⁸ F	109.8 min / β ⁺ (97%)	Позитронно-эмиссионная томография Positron-emission tomography
⁶⁸ Ga-DOTATATE ⁶⁸ Ga-DOTATOC ⁶⁸ Ga-DOTANOC	⁶⁸ Ga	67.6 min / β ⁺ (89%), EC (17%)	
⁶⁴ Cu-DOTATATE	⁶⁴ Cu	1.7 hours / β ⁺ (18%), β ⁻ (37%), EC (24%)	
⁸⁶ Y-DOTATOC	⁸⁶ Y	14.7 hours / β ⁺ (33%) EC (67%)	
¹¹¹ In-pentreoctide ¹¹¹ In-DTPAOC ¹¹¹ In-octreoctide ¹¹¹ In-DOTA-NOC-ATE ¹¹¹ In-DOTA-BOC-ATE ¹¹¹ In-DOTA-lanreoctide	¹²³ I ¹¹¹ In	13.27 hours / EC 100% 2.8 days / EC 100%	Однофотонная эмиссионная компьютерная томография ¹²³ I-октреотид SPECT ¹²³ I-octreoctide
^{99m} Tc-depreotide ^{99m} Tc-octreoctide	^{99m} Tc	6.01 hours / IT* (99.99%) β ⁻ (0.004%)	
⁹⁰ Y-DOTATOC	⁹⁰ Y	64 hours / β ⁻ (100%)	Терапия Therapy
¹⁷⁷ Lu-DOTATOC ¹⁷⁷ Lu-DOTATATE	¹⁷⁷ Lu	6.7 days / β ⁻ (100%)	

Примечание. EC – электронный захват; IT – изомерный переход.
 Note. EC – electron capture; IT – isomeric transition.

Следует отметить, что радиоизотоп ^{99m}Tc, получаемый непосредственно в клиниках из генератора ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, является наиболее приемлемым по цене и идеальным по физико-химическим характеристикам (период полураспада 6 ч, γ-излучение, энергия 140 кэВ) для создания РФП на основе аналогов соматостатина. В настоящее время исследования по разработке технологии мечения аналогов соматостатина технецием-99м активно проводятся по всему миру [17].

Ввиду своей недостаточной реакционной способности аналоги соматостатина, в частности производные октреотида, связывают с технецием-99м только путем предварительного присоединения к нему хелатирующего агента. За рубежом для этого применяют в основном коммерчески недоступный бифункциональный хелатор HYNIC (6-гидразиноникотинамид), неспособный самостоятельно к комплексообразованию без со-лигандов (EDDA (этилендиаминдиуксусная кислота) и трицин в различных модификациях) [18].

Поэтому актуальным является разработка метода получения производных октреотида по-

средством модификации прекурсорами – лигандами с высокой хелатирующей способностью для прочного связывания технецием-99м. Для решение этой задачи успешно могут применяться ω-бис(пиридин-2-илметил)амино)алифатические кислоты [19, 20].

Цель настоящего исследования – создание центра хелатирования путем модификации октреотида с использованием в качестве хелатирующего агента ω-бис(пиридин-2-илметил)амино)алифатических кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали фармацевтическую субстанцию «Октреотид» (АО «Фарм-синтез»), в качестве бифункционального хелатирующего агента – сукцинимид-1-ил 6-(бис(пиридин-2-илметил)амино)гексаноат (DPAH-NHS), синтезированный по разработанной методики на кафедре технологии органических веществ и полимерных материалов НИ ТПУ.

Для исследования, синтеза хелатирующего агента и производного октреотида использовали

субстраты, реагенты и органические растворители, являющиеся товарными продуктами фирм Aldrich (США), Fluka (США) и других соответствующей чистоты.

Методика получения производного октреотида (ДРАН-Октреотид). $1,96 \cdot 10^{-3}$ ммоль (2 мг) октреотида растворяли в 1 мл 10 ммоль PBS (pH = 6,0), добавляли $9,8 \cdot 10^{-3}$ ммоль ДРАН-NHS (2 мг) в 1 мл 10 ммоль PBS (pH = 6,0), содержащем 20% ацетонитрила, перемешивали 24 ч при температуре 4–6 °С. Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью жидкостной хроматографии в подкисленной трифторуксусной кислоте (TFA) в среде ($t_R = 14,09$ мин, система Ultimate 3000 (Thermo, Германия), колонка Luna C18(2) 5 мкм, 100 Å, $250 \times 4,6$ мм, градиент концентрации: 0 мин 100% А (0% В), 5 мин 80% А (20% В), 10 мин 65% А (35% В), 15 мин 50% А (50% В), 25 мин 20% А (80% В), 30 мин 0% А (100% В), 32 мин 95% А (5% В), где система А – 0,1% TFA в воде и система В – 0,1% TFA в ацетонитриле, скорость потока 1 мл/мин). Очистку продукта проводили полупрепаративным методом (система Ultimate 3000 (Dione, Германия), колонка Luna C18(2) 10 мкм, 100 Å, 250×10 мм, градиент концентрации 0 мин 100% А (0% В), 5 мин 80% А (20% В), 10 мин 65% А (35% В), 15 мин 50% А (50% В), 25 мин 20% А (80% В), 30 мин 0% А (100% В), 32 мин 95% А (5% В), где система А – 0,1% TFA в воде и система В – 0,1% TFA в ацетонитриле, скорость потока 5 мл/мин). Фракции, соответствующие целевому продукту ($t_R = 13,09$ мин), объединяли и лиофилизировали. Расчет выходов всех продуктов реакции проводили методом нормирования.

Идентификацию выделенных соединений проводили по масс-спектрам, которые регистрировали, используя высокоэффективный жидкостный хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu) с тандемным масс-спектрометром QTrap 3200 (AB Sciex), снабженный источником ионов для ионизации электрораспылением. Для разделения использовали колонку аналитическую Macherey-Nagel Nucleodur C18 Gravity ($50 \text{ мм} \times 2 \text{ мм}$, 3 мкм) с предколоночным картриджем, термостатируемую при 40 °С. Объем вводимой пробы 1 мкл. В качестве подвижной фазы использовали: элюент А – 0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты, элюент В – ацетонитрил. Элюирование проводили 50%-м раствором элюента В в течение 5 мин. Затем проводили промывание системы в градиентном режиме: 5,5–6 мин 50–100% В; 6–7 мин 100% В; 7–8 мин 50% В. Скорость потока элюента 0,2 мл/мин. Для регистрации октреотида и его производных в режиме положительных

ионов (M+H)⁺ использовали параметры источника ионов: напряжение на капилляре 2,8 кВ, потенциал декластеризации 20 В, входной потенциал – 9 В. В качестве осушающего газа в источнике использовали азот с температурой 300 °С. Для качественной оценки осуществляли полное сканирование ионов с использованием первого квадруполь (Q_1) в диапазоне m/z от 100 до 1 700. Оптимальное время сканирования составило 0,5 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В структуре октреотида, представляющего собой циклический октапептид, можно выделить только две свободные аминогруппы (два N-конца), по которым возможна модификация с образованием амидной связи с ДРАН-NHS. Это аминогруппы в остатках аминокислот D-фенилаланина и L-лизина. При этом аминогруппа в L-лизине имеет минимальное стерическое препятствие и более доступна для образования амидной связи. Следовательно, ацилирование в наших исследованиях проходило предпочтительно по остатку L-лизина. При действии активированного хелатора была получена смесь трех соединений: двух структурных изомеров, различающихся местом образования амидной связи (целевой продукт ДРАН-Октреотид и продукт 2), и продукта 3, содержащего два хелатирующих центра с амидными связями, образованными по двум N-концам одновременно.

Учитывая тот факт, что фармакофорический фрагмент октреотида представлен аминокислотной последовательностью Phe-D-Trp-Lys-Thr, дериватизация в этой части разрушит высокое сродство октреотида к соматостатиновым рецепторам (рис. 1).

Поэтому основными труднорешаемыми проблемами в химической модификации октреотида и других аналогов соматостатина являются повышение избирательности модификации и разделение продуктов синтеза для получения высокоочищенного производного октреотида, обладающего сродством к соматостатиновым рецепторам.

Для повышения избирательности в синтезе было изучено влияние параметров реакции на выходы целевого и нецелевых продуктов химической модификации октреотида (ДРАН-Октреотид, продукт 2 и продукт 3).

Изучение влияния растворителей и pH среды на селективность реакции

Учитывая липофильность ДРАН-NHS, проводить синтез в воде крайне затруднительно, несмотря на гидрофильные свойства октреотида.

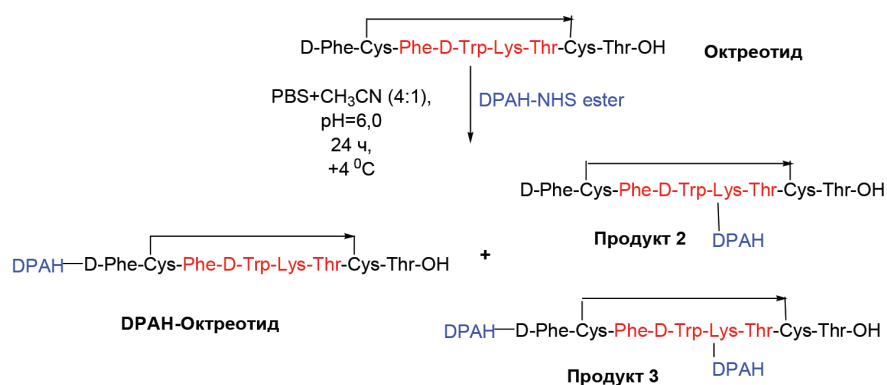


Рис. 1. Схема способа получения производных октреотида (DPAH-Октреотид)

Fig. 1. Scheme of producing octreotide derivatives (DPAH-Octreotide)

Для повышения растворимости DPAH-NHS использовали смесь воды и ацетонитрила. Учитывая влияние pH среды на протекание реакции, более подходящим растворителем вместо воды явился фосфатно-буферный раствор (PBS), подающийся лучшей корректировкой и поддержанию необходимого значения pH реакционной среды. Для того чтобы избежать нежелательного влияния солей буфера, использовали буфер низкой молярности (10 ммоль).

Экспериментально установлено, что увеличение содержания ацетонитрила приводит к повышению выхода продукта 3, поэтому оптимальным является добавление ацетонитрила (до 20% по объему) к раствору PBS, такое количество является достаточным для растворения DPAH-NHS. Также стоит отметить существенное увеличение выхода продукта 3 при использовании в качестве растворителей чистого ацетонитрила, диметилформамида или диметилсульфоксида, являющихся основными растворителями в модификациях аналогов соматостатина.

Повышение pH буферной смеси (более 7) приводит к резкому возрастанию выхода продукта 3 (более 80%). Уменьшение же (pH < 6,5) приводит к снижению скорости реакции образования амидных связей, при этом наблюдается изменение соотношения продуктов реакции в сторону существенного увеличения образования целевого продукта (выход более 20%) и продукта 2 (выход более 60%), являющихся монозамещенными производными октреотида. Снижение pH до 5 приводит к резкому сокращению выхода продуктов реакции модификации, что связано с гидролизом и, следовательно, инактивацией DPAH-NHS в этих условиях. Учитывая вышеизложенное, на данном этапе в качестве среды для синтеза обосновано использование смеси 10 ммоль PBS (pH = 6,0) – ацетонитрила (4 : 1).

Изучение влияния времени проведения реакции на селективность и выход готового продукта

Отбор пробы для анализа проводили каждые 10 мин в течение первого часа, затем каждый час, до 30 ч после начала синтеза. При этом отмечено, что максимальный выход продуктов реакции достигается при проведении синтеза в течение 24 ч, дальнейшее увеличение времени не приводит к изменению выхода продуктов.

Изучение влияния температурного режима на селективность реакции

Использовали температурные режимы: 4–6 °С, 20, 25 и 30 °С. Установлено, что применение температуры 20 °С и выше приводит к возрастанию скорости реакции и увеличению выхода продукта 3 и, соответственно, уменьшению выхода монозамещенных производных октреотида, что является нежелательным. Проведение синтеза при 4–6 °С влияет на замедление скорости реакции, и соотношение продуктов синтеза резко изменяется: уменьшается выход дизамещенного производного и, соответственно, возрастает выход монозамещенных производных октреотида. Поэтому оптимальным является проведение синтеза при пониженной температуре (4–6 °С).

Изучение влияния соотношения субстрата и реагента на селективность реакции

Для оптимизации данного параметра использовали соотношения (моль) октреотида и DPAH-NHS 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 7 соответственно. Как правило, при модификации биомолекул используют мольный избыток хелатирующего агента, при этом достигается максимальная доля прореагировавшего октреотида. При соотношении 1 : 7 непрореагировавшего октреотида остается не более 1%, но при этом резко возрастает выход дизамещенного производного октреотида (свыше 90%). Основное количество октреотида расходуется на дизамещенный продукт,

и выходы монозамещенных продуктов несущественны. Соотношения 1 : 5, 1 : 4 и 1 : 3 октреотида и ДРАН-NHS характеризуются снижением выхода продукта 3 и увеличением выхода целевого продукта и продукта 2. Оптимальным является соотношение 1 : 2 октреотида и ДРАН-NHS, при этом доля прореагировавшего октреотида – более 90%, соотношение целевого продукта, продукта 2 и продукта 3 составляет 1 : 3 : 0,5 соответственно. Значительное уменьшение выхода продукта 3 при этом соотношении приводит к тому, что большая часть октреотида расходуется на образование монозамещенных производных.

Следовательно, экспериментальным путем были подобраны следующие оптимальные условия для модификации октреотида:

- мольное соотношение октреотида и ДРАН-NHS 1 : 2;
- температурный режим 4–6 °С;
- время реакции – 24 ч;
- растворители: смесь 10 ммоль PBS (pH = 6,0) – ацетонитрил в соотношении 4 : 1.

Учитывая, что при модификации октреотида образуется смесь продуктов со схожим строением и физико-химическими свойствами, для разделения производных октреотида и очистки целевого продукта был предложен метод полупрепаративной хроматографии в условиях, достигающих эффективного разделения. В качестве системы для разделения был выбран градиентный режим с использованием 0,1% TFA и 0,1% TFA/ацетонитрила. Следует отметить, что разделение монозамещенных производных октреотида проводили, учитывая различия в константах рKa D-фенилаланина (рKa 7,8) и L-лизина (рKa 10,1) в подвижной фазе, содержащей 0,1% трифторуксусной кислоты. Производные октреотида в этих условиях по-разному протонированы, более протонированным является продукт – производное октреотида по остатку L-лизина, поэтому монозамещенный продукт октреотида по остатку D-фенилаланина будет иметь время удерживания меньше ($t_R = 13,093$ мин), чем монозамещенный продукт октреотида по остатку L-лизина ($t_R = 13,507$ мин). Время удерживания продукта 3 составило $t_R = 14,167$ мин. Каждый продукт после разделения был охарактеризован методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ВЭЖХ/МС (ионизация электрораспылением).

Целевой продукт и другие производные октреотида были получены по данным анализа с чистотой более 99% (рис. 2). Масс-спектры ДРАН-Октреотида и продукта 2 имеют молекулярный ион

1314,1 m/z, что соответствует монозамещенным производным октреотида. Масс-спектр продукта 3 имеет молекулярный ион 1610,7 m/z, что соответствует дизамещенному производному октреотида.

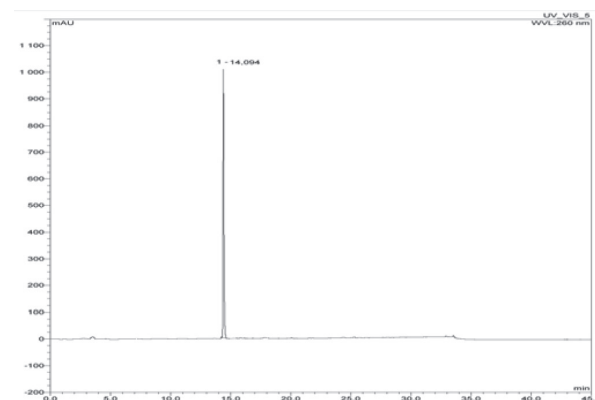


Рис. 2. Репрезентативная высокоэффективная жидкостная хроматограмма ДРАН-Октреотида ($t_R = 14,09$ мин, чистота более 99%)

Fig. 2. Representative high performance liquid chromatography of DРАН-Octreotide ($t_R = 14.09$ min, purity more than 99%)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые разработан способ получения производного октреотида с применением хелатирующего агента ДРАН-NHS в среде 10 ммоль PBS (pH = 6,0) – ацетонитрил в соотношении 4 : 1. Предложены условия аналитической и полупрепаративной хроматографии для анализа и очистки активного производного октреотида, которым является монозамещенное производное октреотида по остатку аминокислоты D-фенилаланина. ДРАН-Октреотид имеет в своей структуре хелатный центр для особо прочного связывания технеция-99m, что делает перспективным дальнейшее изучение его функциональной пригодности для диагностики нейроэндокринных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sundin A., Rockall A. Therapeutic monitoring of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: the challenges ahead. *Neuroendocrinology*. 2012; 96 (4): 261–271. DOI: 10.1159/000342270.
2. Oberg K.E., Reubi J.C., Kwakkeboom D.J. et al. Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology*. 2010; 139 (3): 742–753. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.07.002.
3. Eads J.R., Meropol N.J. A New Era for the Systemic Therapy of Neuroendocrine Tumors. *The Oncologist*. 2012; 17 (3): 326–338. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0356.

4. Strosberg J.R., Fine R.L., Choi J. et al. First-line chemotherapy with capecitabine and temozolomide in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *Cancer*. 2011; 117: 268–275. DOI: 10.1002/cncr.25425.
5. Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радионуклидная тераностика злокачественных образований. *Вестник рентгенологии и радиологии*. 2016; 97 (5): 306–313. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G. et al. Radioimmunotherapy: current state of the problem. *Vestnik Rentgenologii and Radiologii*. 2016; 62 (1): 24–30 (in Russ.)].
6. Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радиоиммунотерапия: современное состояние проблемы. *Вопросы онкологии*. 2016; 62 (1): 24–30. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G. et al. Radioimmunotherapy in the treatment of malignancies. *Questions of Oncology*. 2016; 15 (2): 101–106 (in Russ.)].
7. Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радиоиммунотерапия в лечении злокачественных образований. *Сибирский онкологический журнал*. 2016; 15 (2): 101–106. [Chernov V.I., Bragina O.D., Sinilkin I.G. et al. Radioimmunotherapy in treatment of malignancies. *Siber. J. Oncol.* 2016; 97 (5): 306–313 (in Russ.)].
8. Kwekkeboom D.J., Boen L.K., Martijn E. et al. Somatostatin receptor-based imaging and therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer*. 2010; 17 (1): R53–73. DOI: 10.1677/ERC-09-0078.
10. Kulke M.H., Siu L.L., Tepper J.E. et al. Future directions in the treatment of neuroendocrine tumors: consensus report of the National Cancer Institute Neuroendocrine Tumor clinical trials planning meeting. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29 (7): 934–943. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.2056.
11. Mikołajczak R., Maecke H.R. Radiopharmaceuticals for somatostatin receptor imaging. *Nuclear Medicine Review*. 2016; 19 (2): 126–132. DOI: 10.5603/NMR.2016.0024.
12. Krenning E.P., Kwekkeboom D.J., Bakker W.H. et al. Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In]DT-PA-D-Phe and [¹²³I-tyr]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med.* 1993; 20 (8): 716–731.
13. Kunikowska J., Krrolicki L., Hubalewska-Dydejczyk A., Mikołajczak R. et al. Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with ⁹⁰Y-DOTATATE and tandem ⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu-DOTATATE: which is a better therapy option? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2011; 38 (10): 1788–1797. DOI: 10.1007/s00259-011-1833-x.
14. Kwekkeboom D.J., De Herder W.W., Kam B.L. et al. Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [¹⁷⁷Lu-DOTA₀, Tyr₃]octreotate: toxicity, efficacy, and survival. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26 (13): 2124–2130. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.2553.
15. Makris G., Radford L., Gallazzi F. et al. Synthesis and evaluation of fac-[^{99m}Tc/Re(CO)₃] complexes with a new (N,S,N) bifunctional chelating agent: The first example of a fac-[Re(CO)₃(N,S,N-sst2-ANT)] complex bearing a somatostatin receptor antagonist peptide. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2016; 805: 100–107. DOI: 10.1016/j.jorgchem.2016.01.005.
16. Zhao R., Wang J. et al. Efficacy of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC SPECT/CT scintigraphy in Graves' ophthalmopathy. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2012; 2 (2): 242–247.
17. Wild D., Macke H.R., Waser B. et al. ⁶⁸Ga-DOTANOC: a first compound for PET imaging with high affinity for somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2005; 32 (6): 724. DOI: 10.1007/s00259-004-1697-4.
18. Чернов В.И., Брагина О.Д., Зельчан Р.В. и др. Меченые аналоги соматостатина в тераностике нейроэндокринных опухолей. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2017; 3: 42–49. [Chernov V.I., Bragina O.D., Zelchan R.V. et al. Labeled somatostatin analogues in theranostics of neuroendocrine tumors. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2017; 3: 42–49 (in Russ.)].
19. Behera A., De K., Chandra S. Synthesis, radiolabelling and biodistribution of HYNIC-Tyr₃octreotide: a somatostatin receptor positive tumour imaging agent. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2011; 290: 123–129. DOI: 10.1007/s10967-011-1156-1.
20. Skuridin V., Stasyuk E., Bragina O., Yusubov M., Chernov V., Larkina M., Zelchan R., Rogov A., Sinilkin I., Larionova L. Development of radiopharmaceutical based on mini-antibody for early cancer detection. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. Spain, Barcelona, October 15–19, 2016; 43: 465.
21. Sundararajan C., Besanger T.R., Labiris R. et al. Synthesis and characterization of rhenium and technetium-^{99m} labeled insulin. *J. Med. Chem.* 2010; 53 (6): 2612–2621. DOI: 10.1021/jm100096c.

Вклад авторов

Ларькина М.С., Подрезова Е.В., Кривошеков С.В., Брагина О.Д., Тагирова Е.А. – проведение практической части исследования, разработка концепции, дизайна, анализ и интерпретация данных. Чернов В.И., Юсубов М.С., Нестеров Е.А., Скуридин В.С., Белоусов М.В. – разработка концепции, дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение

Authors contribution

Larkina M.S., Podrezova E.V., Krivoshechekov S.V., Bragina O.D., Tagirova E.A. – carrying out of the practical part of the research, conception and design, analysis and interpretation of the data. Chernov V.I., Yusubov M.S., Nesterov E.A., Skuridin V.S., Belousov M.V. – conception and design, critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for

дение для публикации рукописи. Яновская Е.А., Гурто Р.В. – проведение практической части исследования (хромато-масс-спектрометрия).

publication. Yanovskaya E.A., Gurto R.V. – carrying out of the practical part of the research (chromatography-mass spectrometry).

Сведения об авторах

Ларькина Мария Сергеевна, канд. фарм. наук, доцент, кафедра фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

Подрезова Екатерина Владимировна, аспирант, кафедры технологии органических веществ и полимерных материалов, НИ ТПУ, г. Томск.

Брагина Ольга Дмитриевна, канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник, отделение радионуклидной диагностики, НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск.

Тагирова Екатерина Алексеевна, канд. техн. наук, инженер лаборатории № 31, НИ ТПУ, г. Томск.

Чернов Владимир Иванович, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе и инновационной деятельности, зав. отделением радионуклидной диагностики, НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск.

Юсубов Мехман Сулейман-оглы, д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой технологии органических веществ и полимерных материалов, НИ ТПУ, г. Томск.

Нестеров Евгений Александрович, канд. техн. наук, науч. сотрудник, лаборатория № 31, НИ ТПУ, г. Томск.

Скуридин Виктор Сергеевич, д-р техн. наук, профессор, зав. лабораторией № 31, НИ ТПУ, г. Томск.

Кривошеков Сергей Владимирович, мл. науч. сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ; инженер, кафедра технологии органических веществ и полимерных материалов, НИ ТПУ, г. Томск.

Яновская Елена Анатольевна, канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник, НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск.

Гурто Роман Владимирович, канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск.

Белюсов Михаил Валерьевич, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Ларькина Мария Сергеевна**, e-mail: marialarkina@mail.ru.

Authors information

Larkina Mariia S., PhD, Associate Professor, Pharmaceutical Analysis Division, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Podrezova Ekaterina V., Post-Graduate Student, Division of Technology of Organic Substances and Polymer Materials, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Bragina Olga D., PhD, Junior Researcher, Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation.

Tagirova Ekaterina.A., PhD, Engineer, Laboratory No. 31, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Chernov Vladimir I., DM, Professor, Head of the Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation.

Yusubov Mekhman S., DChSc, Professor, Head of the Division of Technology of Organic Substances and Polymer Materials, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Nesterov Evgeny A., PhD, Researcher, Laboratory No. 31, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Skuridin Victor S., DTSc, Professor, Head of the Laboratory No. 31, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Krivoshekov Sergey V., Junior Researcher, Central Research Laboratory, SSMU; Engineer; Division of Technology of Organic Substances and Polymer Materials, NR TPU, Tomsk, Russian Federation

Yanovskaya Elena A., PhD, Junior Researcher, GRIPhRM, Tomsk NRMC, Tomsk, Russian Federation.

Gurto Roman V., PhD, Leading Researcher, GRIPhRM, Tomsk NRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Belousov Mikhail V., DPhSc, Professor, Head of the Division of Pharmaceutical Analysis, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Larkina Mariia S.**, e-mail: marialarkina@mail.ru.

Received 15.11.2017

Accepted 11.06.2019

Поступила в редакцию 15.11.2017

Подписана в печать 11.06.2019