

# ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ АМИНОДИФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОСТЕОТРОПНЫХ $^{68}\text{Ga}$ -РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2020 г. Ю. А. Митрофанов<sup>a,\*</sup>, А. Я. Марук<sup>a,b</sup>, А. А. Ларенков<sup>a,c</sup>, Г. Е. Кодина<sup>a</sup>, А. С. Лунёв<sup>a</sup>, К. А. Лунёва<sup>a</sup>, О. Е. Клементьева<sup>a</sup>, Г. С. Цебрикова<sup>b</sup>, В. Е. Баулин<sup>b,d</sup>, В. В. Рагулин<sup>d</sup>, А. Ю. Цивадзе<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Государственный научный центр Российской Федерации «Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», Живописная ул. 46, Москва, 123098 Россия

<sup>b</sup> Институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>c</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>d</sup> Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, 142432 Россия

\*e-mail: mitrofanoff.yura@yandex.ru

Поступило в Редакцию 19 августа 2019 г.

После доработки 19 августа 2019 г.

Принято к печати 22 августа 2019 г.

Изучено связывание  $^{68}\text{Ga}$  с двумя органическими лигандами, содержащими аминодифосфоновые группы: 1,7-диамино-4-оксагептан-1,1,7,7-тетрафосфоновой и 1,7-диамино-4-гидроксикарбонилгептан-1,1,7,7-тетрафосфоновой кислотами. Проведена оценка устойчивости и остеотропного потенциала полученных соединений.

**Ключевые слова:**  $^{68}\text{Ga}$ , дифосфонаты, аминодифосфоновые кислоты, остеотропные радиофармпрепараты, гидроксиапатит

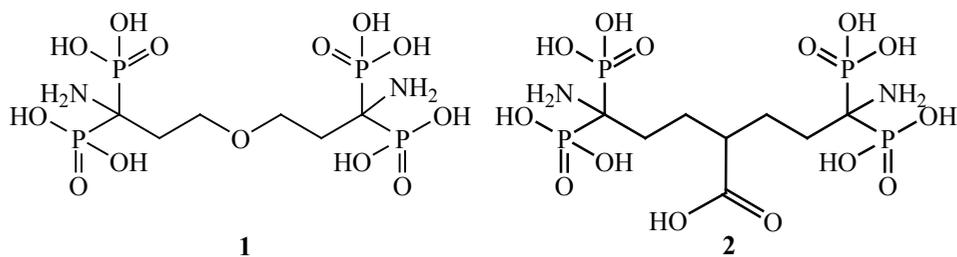
**DOI:** 10.31857/S0044460X20030102

Костная ткань часто подвергается метастатическим поражениям при различных онкологических заболеваниях. Физические свойства костного матрикса, его структура и локальные изменения, связанные с его перестройкой, создают среду, благоприятную для роста и развития раковых клеток [1–3]. Поражения скелета на ранних стадиях зачастую не поддаются диагностике при использовании рентгеновских методов. Поэтому в клинической практике при исследовании метастазов в скелете значительное место занимают методы ядерной медицины [4], что подразумевает использование радиофармацевтических лекарственных препаратов. С этой целью в конце 70-х годов было предложено использование комплексов радионуклидов-металлов с производными фосфоновых кислот –

фосфонатами – содержащими дифосфоновую группу P–C–P. В литературе встречаются различные названия данного класса соединений: дифосфонаты, бифосфонаты, бисфосфонаты. При этом количество фосфоновых групп в молекуле может быть больше двух. Наличие дифосфонового участка обуславливает остеотропные свойства этих соединений из-за сходства с биологическим аналогом – пирофосфатом. Однако в отличие от пирофосфата фосфонаты устойчивы к ферментативному гидролизу. Это делает фосфонаты перспективными агентами для создания остеотропных радиофармацевтических лекарственных препаратов [5–8].

Для целей радионуклидной диагностики одним из наиболее перспективных радионуклидов счита-

Схема 1.



ется позитрон-излучающий  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 67.71$  мин) [9–11]. В последние годы ведутся работы по изучению комплексов  $^{68}\text{Ga}$  с фосфонатами различной структуры [12–16].

Объектами настоящего исследования являются два новых соединения, содержащих аминокислотные фрагменты: 1,7-диамино-4-оксагептан-1,1,7,7-тетрафосфоновая (лиганд **1** [17], схема 1) и 1,7-диамино-4-гидроксикарбонилгептан-1,1,7,7-тетрафосфоновая кислоты (лиганд **2** [18]).

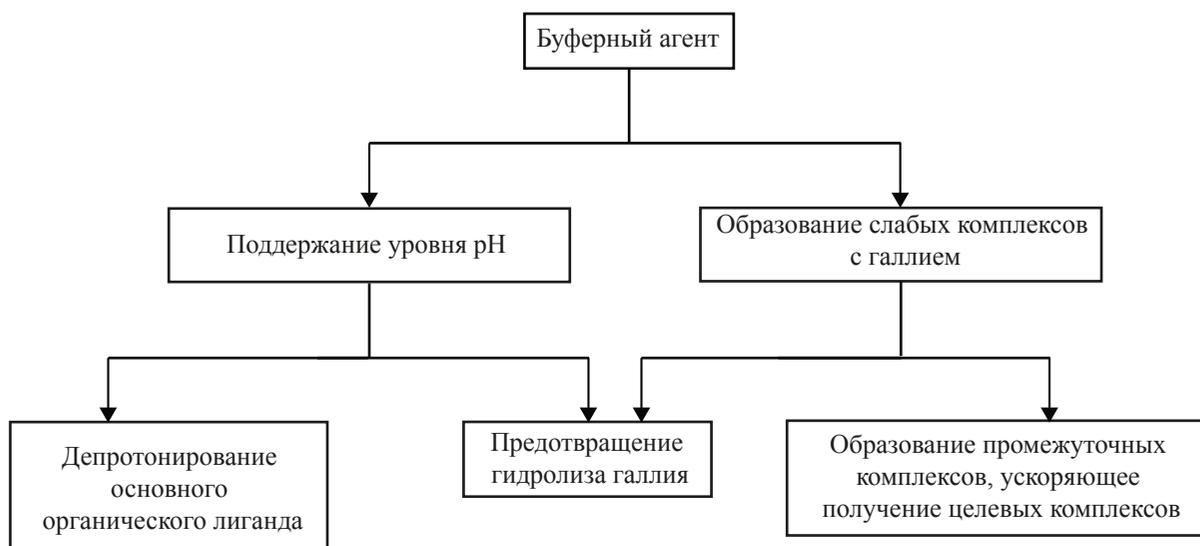
Целью работы являлось изучение связывания лигандов **1** и **2** с  $^{68}\text{Ga}$ , а также оценка остеотропного потенциала полученных соединений с помощью экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

**Влияние pH среды и вида буферного агента на связывание с  $^{68}\text{Ga}$ .** Известно, что кислотность реакционной смеси влияет на выход реакции комплексообразования галлия и состав радиохимических примесей. При производстве радиофармацев-

тических лекарственных препаратов, как правило, используют различные буферные агенты, позволяющие не только варьировать уровень кислотности реакционных смесей, но и предотвращать образование радиоактивных коллоидов за счет слабых комплексообразующих свойств этих буферных агентов по отношению к  $^{68}\text{Ga}$  [19]. Еще одним свойством органических буферных систем по отношению к  $^{68}\text{Ga}$  считается их способность образовывать промежуточные комплексы, облегчающие образование целевых соединений [20]. Таким образом, роль буферных агентов в синтезе радиофармацевтических лекарственных препаратов с  $^{68}\text{Ga}$  можно обобщить схемой 2.

В настоящей работе исследовано влияние различных буферных агентов на связывание лигандов **1** и **2** с  $^{68}\text{Ga}$ . Выбранные для исследования органические соединения (ацетат, сукцинат, лактат, тартрат) являются наиболее часто используемыми при синтезе радиофармацевтических лекарствен-

Схема 2.



**Таблица 1.** Зависимость радиохимической чистоты препаратов [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1 (%) в от концентрации лиганда 1<sup>a</sup>

| Буфер      | $pK_a$ ( $pK_{a1}$ )<br>[21] | Концентрация лиганда 1, мМ. |       |       |     |
|------------|------------------------------|-----------------------------|-------|-------|-----|
|            |                              | 0.2                         | 0.7   | 1.2   | 2.4 |
| Без буфера | –                            | 60±10                       | 70±10 | 80±10 | >90 |
| Карбонат   | 6.35                         | 60±10                       | 70±10 | 80±10 | >90 |
| Ацетат     | 4.75                         | 70±10                       | 80±10 | 80±10 | >90 |
| Сукцинат   | 4.21                         | 70±10                       | 80±10 | 80±10 | >90 |
| Лактат     | 3.86                         | 70±10                       | 80±10 | 80±10 | >90 |
| Тартрат    | 3.03                         | 80±10                       | 80±10 | >90   | >90 |

<sup>a</sup> Условия реакции: инкубирование в течение 30 мин при 25°C.

ных препаратов, что обусловлено значениями констант диссоциации соответствующих кислот [19]. Для сравнения были проведены серии экспериментов с использованием карбоната натрия в качестве буфера, а также без буферных агентов.

В результате исследования препаратов [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1, полученных с использованием перечисленных буферных систем при pH в диапазоне от 2 до 6, а также при использовании различных концентраций лиганда, не было выявлено значительного влияния кислотности на радиохимическую чистоту получаемых комплексов. В табл. 1 представлены данные о зависимости радиохимической чистоты препаратов [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1, полученных с использованием разных буферных систем, от концентрации лиганда 1. Как видно из табл. 1, с уменьшением значений  $pK_a$  уменьшается концентрация лиганда 1, необходимая для получения [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1. Очевидно, что более низкие значения  $pK_a$  повышают вероятность образования слабых комплексных соединений галлия с соответствующими кислотными остатками. В свою очередь, за счет одного или нескольких перечисленных выше факторов образование таких комплексов повышает выход связывания  $^{68}\text{Ga}$  с лигандом 1. Кроме того, можно предположить, что присутствующие в растворе анионы, могут оставаться в координационной сфере галлия вместе с лигандом 1, образуя смешанные комплексы.

Соединение [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-2 образуется с выходом >90% уже при концентрации лиганда 2, равной 0.7 мМ. (при всех остальных условиях проведения реакций, аналогичных экспериментам с лигандом

1). При концентрации лиганда 2, равной 0.2 мМ., радиохимическая чистота всех препаратов находится в диапазоне от 70 до 90%. Таким образом, лиганд 2 обладает большей хелатирующей способностью по отношению к галлию, по сравнению с лигандом 1, что, вероятно, обусловлено наличием дополнительной карбоксильной группы в структуре лиганда 2.

Реакции  $^{68}\text{Ga}$  с лигандами 1 и 2 протекают практически мгновенно, а радиохимическая чистота получаемых реакционных смесей остается постоянной в течение 2 ч.

**Оценка сродства препаратов [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1 и [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-2 к гидроксиапатиту.** Эксперименты по оценке сродства получаемых комплексных соединений к гидроксиапатиту проводили по методике, аналогичной описанной в работах [22, 23]. Значение коэффициентов сорбции для всех исследованных препаратов составило  $98.6 \pm 0.2\%$ , что может говорить о высоком остеотропном потенциале полученных соединений. В ходе эксперимента было также изучено сродство к гидроксиапатиту холостых образцов, полученных аналогично препаратам [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1 и [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-2, но без добавления лигандов 1 и 2. Результаты ТСХ этих препаратов показали, что основными формами  $^{68}\text{Ga}$  в них (> 85%) являются ионные. При этом сорбция  $^{68}\text{Ga}$  на гидроксиапатите из таких препаратов составляет  $90 \pm 10\%$ . Полученные результаты в значительной мере согласуются с данными, представленными в работе [13], где такое явление приписано образованию коллоидного гидроксида галлия. Методика эксперимента (использование

контрольных образцов без гидроксиапатита), использованная в данной работе, позволяет учесть погрешность на неспецифическое осаждение коллоидных форм галлия. Таким образом, видно, что  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  и/или другие ионные формы сами по себе характеризуются неспецифической сорбцией на гидроксиапатите, что делает эту модель непригодной для оценки остеотропного потенциала любых радиофармацевтических лекарственных препаратов на основе  $^{68}\text{Ga}$ .

**Исследование стабильности препаратов  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$  и  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$ .** Исследование стабильности препаратов  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$  и  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$  проводили в различных средах: изотоническом растворе натрия хлорида, 0.05 М. буферном растворе Трис-НСI и эмбриональной сыворотке бычьей крови. Соотношение объемов препарат–среда составляло 1:10. Смеси инкубировали с постоянным перемешиванием при 37°C. Таким образом, концентрация лигандов в смесях со средами снизилась относительно концентрации в реакционной смеси в 11 раз и, например, для лиганда **1** составила 0.22 мМ.

Результаты исследования показали, что внесение готового препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$  с радиохимической чистотой  $\geq 95\%$  в указанные среды приводит к частичному разрушению комплексов. В изотоническом растворе натрия хлорида и буферном растворе Трис-НСI содержание радиохимических примесей возрастает вне зависимости от вида используемого при комплексообразовании буферного агента на  $13\pm 5\%$ , а в сыворотке крови – на  $16\pm 5\%$ . Количество появившихся в смеси с сывороткой радиохимических примесей несущественно изменяется с течением времени и содержание исследуемых комплексов остается на уровне 80%. Причиной наблюдаемого явления может являться снижение концентрации лиганда и смещение равновесия в сторону образования свободного галлия.

Для более детального изучения стабильности комплексов  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$  в смесях с сывороткой были проведены эксперименты с различным содержанием лиганда **1**: 0.05–10 мМ. В качестве буферного агента в этом эксперименте использовали ацетат натрия. Установлено, что с увеличением концентрации лиганда **1** увеличивается стабильность препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$  и 90% комплексов сохраняются в неизменном виде только при кон-

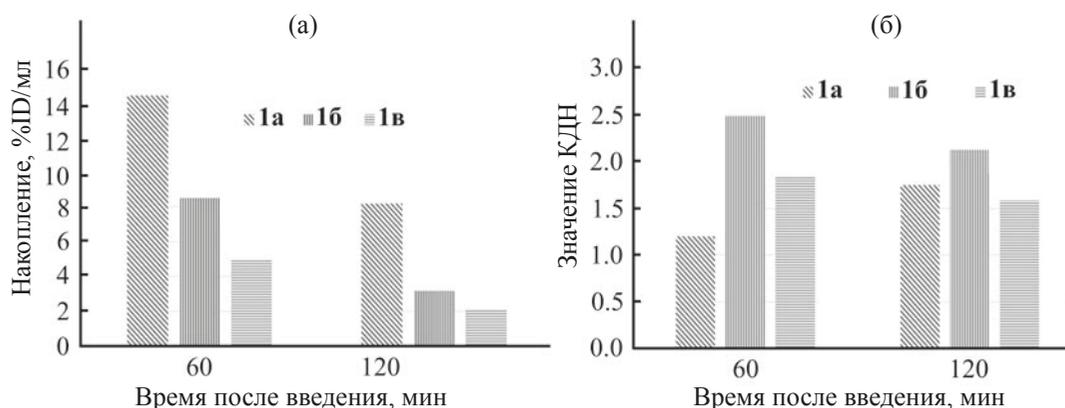
центрациях лиганда **1** не ниже 5 мМ. в конечной смеси.

Исследования стабильности препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$  дали аналогичные результаты. При смешивании препарата ( $[\text{2}] = 1.2$  мМ., радиохимическая чистота 99%) с 0.9%-ным раствором NaCl в соотношении 1:10 содержание свободного галлия увеличивается на  $19\pm 2\%$ . Лабильность комплексов  $^{68}\text{Ga}$  с лигандом **2** в сыворотке оказалась выше, чем комплексов  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ : даже при концентрации 5 мМ. в смеси с сывороткой в неизменном виде сохраняется 74% комплексов  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$ .

Полученные результаты согласуются с литературными данными, представленными ранее для ациклического этилендиаминтетраметилфосфоната, имеющего структуру, схожую с лигандами **1** и **2** [13, 24]. Авторами данных работ отмечено, что, ввиду низкой стабильности комплексов  $^{68}\text{Ga}$  с ациклическими фосфонатами *in vivo*, необходимо повышение концентрации лиганда для улучшения накопления комплексов в костной ткани.

**Биораспределение.** В качестве модели патологии был выбран закрытый перелом в стадии активного формирования костной мозоли. Такой выбор сделан на основании физиолого-биохимического сходства механизма формирования костной мозоли на первичном этапе и остеолита, спровоцированного экспрессией опухолевых паракринных факторов, вызывающих процесс реконструкции кости [25].

С целью выявления патологических изменений в костях пациента при позитронно-эмиссионной томографии (или однофотонной эмиссионной компьютерной томография) производят вычисление коэффициентов дифференциального накопления (КДН). Эти коэффициенты представляют собой отношение числа импульсов на одну ячейку матрицы компьютера в зоне поражения к контрольному участку на единицу площади. Чем больше разница между накоплением меченого соединения в интересующей области и накоплением в прилегающих к ней интактных органах (т. е. чем выше значение КДН), тем лучше качество получаемого изображения [26]. По результатам радиометрии проб, полученных в данном исследовании, были рассчитаны значения КДН, характеризующие соотношение накопления в очаге костной патоло-



Накопление в крови (а) и КДН очаг патологии–интактная кость препаратов  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1a}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1b}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-16}$ .

гии и интактной костной ткани для препаратов  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$  и  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$  соответственно.

В первых опытах по исследованию биораспределения полученных комплексов в качестве биологических тест-систем были использованы самки белых беспородных крыс. Концентрации лигандов в препаратах были выбраны исходя из результатов экспериментов по эффективности связывания  $^{68}\text{Ga}$  с лигандами: 2.4 мМ. (1.08 мг/мл) для лиганда **1** и 1.2 мМ. (0.6 мг/мл) для лиганда **2**. Объемная активность препаратов составляла 37 МБк/мл на момент введения. Стандартные отклонения получены для  $n = 3$ . Результаты математической обработки данных

радиометрии проб, включая значения КДН, представлены в табл. 2.

Анализ полученных данных показывает, что оба соединения характеризуются минимальным накоплением в мышечной ткани. Содержание радиоактивности в крови было практически стабильным на протяжении 120 мин после введения, что может говорить о медленном клиренсе изученных соединений. Что касается накопления исследованных соединений в поврежденной кости, то для них отмечается увеличение аккумуляции со временем в 1.7 раза для препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$  и практически стабильное удержание для препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ . Полученные соотношения поврежденная–интакт-

Таблица 2. Динамика распределения исследуемых комплексов в организме крыс

| Органы и ткани                 | Время после введения, мин     |           |                               |           |
|--------------------------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|
|                                | 60                            | 120       | 60                            | 120       |
|                                | $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ |           | $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$ |           |
| Кровь <sup>а</sup>             | 1.77±0.37                     | 1.68±0.21 | 2.45±0.15                     | 2.02±0.41 |
| Печень <sup>б</sup>            | 11.65±1.21                    | 7.00±0.98 | 10.36±1.69                    | 8.53±0.46 |
| Почки <sup>б</sup>             | 0.87±0.12                     | 0.97±0.05 | 0.97±0.15                     | 1.03±0.18 |
| Мышечная ткань <sup>а</sup>    | 0.26±0.01                     | 0.29±0.05 | 0.26±0.01                     | 0.26±0.07 |
| Очаг патологии <sup>а</sup>    | 1.02±0.23                     | 1.11±0.05 | 1.15±0.21                     | 2.03±0.45 |
| Бедро, норма <sup>а</sup>      | 0.79±0.21                     | 0.66±0.14 | 0.56±0.10                     | 0.95±0.26 |
| Очаг патологии/интактная кость | 1.29±0.09                     | 1.74±0.35 | 2.04±0.15                     | 2.53±0.38 |

<sup>а</sup> Удельное накопление активности измеряется в процентах от введенной дозы, приходящихся на грамм исследуемого органа (ткани) (%ID/g). <sup>б</sup> Накопление активности измеряется в % от введенной дозы, приходящихся на исследуемый орган (%ID/орган).

**Таблица 3.** Факторы удерживания основных химических форм  $^{68}\text{Ga}$  в использованных хроматографических системах

| Форма галлия                       | $R_f$       |             |             |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                    | система № 1 | система № 2 | система № 3 |
| Гидролизированный $^{68}\text{Ga}$ | 0.00±0.05   | 0.00±0.05   | 0.00±0.05   |
| Свободный $^{68}\text{Ga}$         | 0.95±0.05   | 0.95±0.05   | 0.77±0.06   |
| $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$      | 0.00±0.05   | 0.85±0.05   | 0.00±0.05   |
| $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$      | 0.50±0.50   | 0.95±0.05   | 0.00±0.05   |

ная кость близки к значениям КДН, отмечаемым для многих остеотропных препаратов, уже применяемых в клинической практике [4]. Данные о накоплении активности в крови согласуются с данными, полученными при изучении стабильности *in vitro*.

Для исследования влияния концентрации лиганда на распределение активности *in vivo* были выбраны препараты  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$  с различным содержанием лиганда **1**: 2.4 мМ. (1.08 мг/мл, препарат  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1a}$ ), 42 мМ. (19 мг/мл,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1б}$ ), 89 мМ. (40 мг/мл,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1в}$ ). Уровень pH препарата доводили до 6 раствором уксусной кислоты. Объемная активность препаратов на момент введения составляла 15–18 МБк/мл. В качестве биологических тест-систем были выбраны самки мышей линии BALB/c в количестве 3 особей на исследуемую точку.

Увеличение концентрации лиганда **1** во вводимых препаратах привело к статистически достоверной практически линейной обратной зависимости содержания активности в крови от концентрации для обоих соединений (см. рисунок). Содержание препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1a}$  в крови составило 14.4% от введенной активности на 1 мл через 60 мин после введения и 8.2% от введенной активности на 1 мл через 120 мин. При увеличении концентрации лиганда **1** в 17.5 и 37 раз содержание в крови уменьшается через 60 мин после введения в 1.7 и 2.9 раза соответственно.

В очагах костной патологии зависимость уровня аккумуляции от концентрации лигандов не была линейной, однако следует отметить тенденцию к ее снижению с ростом концентрации в первый час после введения. Через 120 мин после введения максимальное накопление в очаге патологии отмечено для препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1б}$ . Максимальные

значения соотношения очаг патологии–интактная кость также отмечено для препарата  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1б}$ .

Таким образом, показана возможность получения комплексов  $^{68}\text{Ga}$  с новыми фосфонатами с выходами, близкими к 100%, а также изучено влияние буферных агентов на этот процесс. Результаты экспериментов на лабораторных животных показали, что соотношения поврежденная–интактная кость для комплексов  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$  и  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$  находятся в диапазоне 1.2–2.5, что близко к значениям КДН, отмечаемым для остеотропных препаратов, применяемых в клинической практике.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все использованные в работе реактивы относились к классу химически и особо чистых (Sigma-Aldrich, Panreac). Лиганды **1** и **2** синтезированы по методикам, описанным в работах [17] и [18] соответственно. В настоящем исследовании использованы генераторы  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  производства ЗАО «Циклотрон» (Обнинск, Россия) с активностью 20 и 50 мКи (сроки использования 0–12 мес с даты изготовления).

**Подготовка растворов  $^{68}\text{Ga}$ .** Генератор элюировали 0.1 М. раствором HCl согласно инструкции производителя (ЗАО «Циклотрон»). Для кондиционирования (очистки и концентрирования) элюата генератора  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , использовали HCl–этанол метод [27] на модуле Modular-Lab PharmTracer, (Eckert & Ziegler, Германия). Измерение абсолютной активности  $^{68}\text{Ga}$  проводили на радиометре Atomlab™ 500 Dose Calibrator (Biodex, США).

**Проведение реакции связывания  $^{68}\text{Ga}$  с лигандами.** В пробирки типа Эппендорф, содержащие 0.25–2.4 мкмоль лигандов, добавляли 200–900 мкл 0.2 М. раствора буферного агента (ацетата, сукцината, тартрата, лактата или карбоната на-

трия), 0–700 мкл 0.1 М. раствора HCl и 100 мкл элюата генератора  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ . В реакционных смесях без буферных агентов значения pH изменяли путем варьирования соотношения объемов 0.1 М. растворов NaOH и HCl.

Реакционные смеси инкубировали с перемешиванием при температуре 25°C в течение 15 мин. Объем и активность каждого препарата составляли 1 мл и 10–100 МБк соответственно. Измерение pH проводили по истечении не менее 10 периодов полураспада  $^{68}\text{Ga}$ .

**Определение радиохимической чистоты препаратов.** Для определения количества основных радиохимических примесей препаратов  $^{68}\text{Ga}$  использовали ТСХ с радиометрическим детектированием с помощью сканера для тонкослойной радиохроматографии miniGita Star (Raytest Isotopenmeßgerate GmbH, Германия). За радиохимическую чистоту препаратов принимали разницу между 100% и содержанием радиохимических примесей. Радиохимические примеси представлены гидролизованным и свободным [28] галлием. Для анализа препаратов [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1 выбраны следующие хроматографические системы:

– система № 1: неподвижная фаза – целлюлоза на алюминиевой подложке (105574, Merck), элюент – HCl (2.4 мас%)–ацетон–ацетилацетон, 0.8:7:0.5 [29, 30];

– система № 2: неподвижная фаза – целлюлоза на алюминиевой подложке (105574, Merck), элюент – HCl (1 М.)–метанол, 2:1;

– система № 3: неподвижная фаза – хроматографическая бумага Whatman № 2 (W. & R. Balston Ltd.), элюент – раствор трифторуксусной кислоты 0.1 об% в смеси ацетонитрил–вода, 1:1 [28].

Факторы удерживания  $R_f$ , характерные для основных химических форм галлия в использованных системах представлены в табл. 3.

**Оценка средства [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1 и [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-2 к гидроксипатиту.** 50 мкл препарата с радиохимической чистотой  $\geq 95\%$  добавляли к 500 мкл суспензии 5 мг/мл гидроксипатита (нанопорошок, размер частиц < 200 нм, Sigma-Aldrich, США) в буферном растворе Трис-HCl 0.05 М. (pH = 7.4). Контрольный образец готовили по этой же методике без добавления гидроксипатита (препарат:буфер = 1:10, по объему). Полученные образцы ин-

кубировали 1 ч при 37°C, затем центрифугировали 10 мин (14000 об/мин), отбирали по 50 мкл надосадочной жидкости из каждой смеси и измеряли их активность с помощью  $\gamma$ -счетчика WIZARD 2480 (PerkinElmer, США).

Коэффициент связывания рассчитывали по формуле (1).

$$K = \left( 1 - \frac{a_{\text{иссл}}}{a_{\text{контр}}} \right) \times 100\%, \quad (1)$$

где  $a_{\text{иссл}}$  – скорость счета аликвоты исследуемого образца,  $a_{\text{контр}}$  – скорость счета контрольного образца.

**Изучение стабильности и препаратов [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1 и [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-2.** Для определения стабильности полученных комплексов 100 мкл препарата добавляли к 1000 мкл следующих растворов: 0.9% NaCl, буферного раствора Трис-HCl 0.05 М. (pH = 7.4) и эмбриональной сыворотке бычьей крови. Смеси инкубировали с постоянным перемешиванием при 37°C в течение 2 ч. Анализ образцов проводили каждые полчаса с применением ТСХ-систем, описанных выше.

**Исследование биораспределения.** Исследование динамики распределения меченых соединений выполнено на самках белых беспородных крыс и самках мышей линии BALB/c. Животные получены из питомника КролИнфо. Эксперименты проведены с соблюдением норм и правил обращения с позвоночными животными, предназначенными для научных исследований [31].

Для проведения исследований использовали растворы соединений [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-1 и [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-2 с объемной активностью 15–37 МБк/мл. Радиометрию проб выполняли с использованием автоматического  $\gamma$ -счетчика Wizard 2480. Полученные данные использованы для расчета доли аккумуляции радиофармацевтических лекарственных препаратов в органах (пробах) по формуле (2).

$$A_k = \frac{A_{\text{пробы}}}{A_{\text{тушки}}} \times 100, \quad (2)$$

где  $A_{\text{пробы}}$  – счет образца в имп/мин;  $A_{\text{тушки}}$  – счет от всех органов тушки каждого животного в имп/мин.

Содержание меченых соединений выражали в % от всей активности, зарегистрированной в тушке

животного, на весь исследуемый орган (%/орган), а для проб крови, очага патологии, мышечной и костной тканей на 1 г ткани (%/г).

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00262, синтез лигандов) и Российского научного фонда (проект № 19-13-00294, радиохимические и биологические исследования).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roodman G.D. // *N. Engl. J. Med.* 2004. Vol. 350. N 16. P. 1655. doi 10.1056/NEJMra030831
2. Weilbaecher K.N., Guise T.A., McCauley L.K. // *Nat. Rev. Cancer.* 2011. Vol. 11. N 6. P. 411. doi 10.1038/nrc3055
3. Zheng Y., Zhou H., Dunstan C.R., Sutherland R.L., Seibel M.J. // *J. Bone Oncol.* 2013. Vol. 2. N 1. P. 47. doi 10.1016/J.JBO.2012.11.002
4. Кодина Г.Е., Малышева А.О., Клементьева О.Е. // *Изв. АН Сер. хим.* 2016. № 2. С. 350; Kodina G.E., Malysheva A.O., Klement'eva O.E. // *Russ. Chem. Bull.* 2016. Vol. 65. N 2. P. 350. doi 10.1007/s11172-016-1308-0
5. Russell R.G.G. // *Bone.* 2011. Vol. 49. N 1. P. 2. doi 10.1016/j.bone.2011.04.022
6. Fleisch H., Russell R.G.G., Bisaz S., Casey P.A., Mühlbauer R.C. // *Calcif. Tissue Res.* 1968. Vol. 2. N 1. P. 10. doi 10.1007/BF02065192
7. Kochmant M., Rutter W.J., Horecker B.L., Nat P., Sci A., Two A. // *Science.* 1969. Vol. 165. N 3899. P. 1262. doi 10.1126/science.165.3899.1262
8. Russell R.G.G., Watts N.B., Ebeti N.F.H., Rogers M.J. // *Osteoporos. Int.* 2008. Vol. 19. N 6. P. 733. doi 10.1007/s00198-007-0540-8
9. Ларенков А.А., Кодина Г.Е., Брускин А.Б. // *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2011. Т. 56. № 5. С. 56.
10. Roesch F., J. Riss P. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2012. Vol. 10. N 16. P. 1633. doi 10.2174/156802610793176738
11. Velikyani I. // *Theranostics.* 2014. Vol. 4. N 1. P. 47. doi 10.7150/thno.7447
12. Wu Z., Zha Z., Choi S.R., Plössl K., Zhu L., Kung H.F. // *Nucl. Med. Biol.* 2016. Vol. 43. N 6. P. 360. doi 10.1016/j.nucmedbio.2016.03.002
13. Fellner M., Riss P., Loktionova N., Zhernosekov K., Thews O., Gerald C.F.G.C., Kovacs Z., Lukeš I., Rösch F. // *Radiochim. Acta.* 2011. Vol. 99. N 1. P. 43. doi 10.1524/ract.2011.1791
14. Tadayon N., Yousefnia H., Ramazani A., Zolghadri S., Alirezapour B., Jalilian A.R., Afarideh H., Vaez-Tehrani M. // *J. Med. Imaging Radiat. Sci.* 2019. Vol. 50. N 1. P. 142. doi 10.1016/j.jmir.2018.10.004
15. Farrell K.B., Karpeisky A., Thamm D.H., Zinnen S. // *Bone Rep.* 2018. Vol. 9. P. 47. doi 10.1016/j.bonr.2018.06.007
16. Mirzaei A., Jalilian A.R., Badbarin A., Mazidi M., Mirshojaei F., Geramifar P., Beiki D. // *Ann. Nucl. Med.* 2015. Vol. 29. N 6. P. 506. doi 10.1007/s12149-015-0971-9
17. Цебрикова Г.С., Баулин В.Е., Калашиникова И.П., Рагулин В.В., Завельский В.О., Кодина Г.Е., Цивадзе А.Ю. // *ЖОХ.* 2016. Т. 86. № 3. С. 499; Tsebrikova G.S., Baulin V.E., Kalashnikova I.P., Ragulin V.V., Zavel'skii V.O., Kodina G.E., Tsivadze A.Y. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2016. Vol. 86. N 3. P. 639. doi 10.1134/s107036321603021x
18. Ларенков А.А., Митрофанов Ю.А., Марук А.Я., Кодина Г.Е., Рагулин В.В., Цебрикова Г.С., Баулин В.Е. // *Сборник тезисов докл. XIII Конф. молодых ученых, аспирантов и студентов ИФХЭ РАН, Москва, 2018.* С. 224.
19. Bauwens M., Chekol R., Vanbilloen H., Bormans G., Verbruggen A. // *Nucl. Med. Commun.* 2010. Vol. 31. N 8. P. 753. doi 10.1097/MNM.0b013e32833acb99
20. Morfin J.F., Tóth É. // *Inorg. Chem.* 2011. Vol. 50. N 20. P. 10371. doi 10.1021/ic201445e
21. Haynes W.M., Lide D.R., BruN T.J. *CRC Handbook of Chemistry and Physics.* Boca Raton: CRC Press, 2017. 2643 p.
22. Ogawa K., Mukai T., Arano Y., Otaka A., Ueda M., Uehara T., Magata Y., Hashimoto K., Saji H. // *Nucl. Med. Biol.* 2006. Vol. 33. N 4. P. 513. doi 10.1016/j.nucmedbio.2006.03.006
23. Song X., Wang Y., Zhang J., Jin Z., Zhang // *Int. J. Lab. Hematol.* 2016. Vol. 38. N 1. P. 42. doi 10.1111/cbdd.13117
24. Bai H.S., Jin H.X., Fan H.Q., Du J., Wang F., Chen D.M., Cheng Z. // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 1998. Vol. 236. N 1–2. P. 87. doi 10.1007/BF02386323

25. *Моисеенко В.М., Блинов Н.Н.* Современная тактика лечения больных злокачественными новообразованиями с метастазами в кости: пособие для врачей. СПб: Министерство здравоохранения РФ, НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, 1996. 32 с.
26. *Волознев Л.В., Клементьева О.Е., Корсунский В.Н., Лысенко Н.П.* // Молекулярная медицина. 2013. Т. 2. С. 42.
27. *Larenkov A.A., Bruskin A.B., Kodina G.E.* // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2015. Vol. 305. N 1. P. 147. doi 10.1007/s10967-015-4089-2
28. *Ларенков А.А., Марук А.Я., Кодина Г.Е.* // Радиохимия. 2018. Т. 60. № 6. С. 535; *Larenkov A.A., Maruk A.Ya., Kodina G.E.* // Radiochemistry. 2018. Vol. 60. N 6. P. 625. doi 10.1134/s0134347518060104
29. *Fellner M., Biesalski B., Bausbacher N., Kubicek V., Hermann P., Rösch F., Thews O.* // Nucl. Med. Biol. 2012. Vol. 39. N 7. P. 993. doi 10.1016/j.nucmedbio.2012.04.007
30. *Meckel M., Bergmann R., Miederer M., Roesch F.* // EJNMMI Radiopharm. Chem. 2017. T. 1. N 1. P. 1. doi 10.1186/s41181-016-0017-1
31. *Palisaitis D., Love M., Zimmerman R., Radhakrishnan S., Welsh R., Saw J., Renner S., Kells C., Schampaert E.* // Can. J. Cardiol. 2011. Vol. 27. N 6. P. 865. doi 10.1016/j.cjca.2011.06.009

## Assessment of Applicability of Aminodiphosphonic Acids for Development of Osteotropic $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaceuticals

Iu. A. Mitrofanov<sup>a,\*</sup>, A. Ya. Maruk<sup>a,b</sup>, A. A. Larenkov<sup>a,c</sup>, G. E. Kodina<sup>a</sup>,  
A. S. Luneva<sup>a</sup>, K. A. Luneva<sup>a</sup>, O. E. Klementyeva<sup>a</sup>, G. S. Tsebrikova<sup>b</sup>, V. E. Baulin<sup>b,d</sup>,  
V. V. Ragulin<sup>d</sup>, and A. Yu. Tsivadze<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Russian State Research Center "Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency", Moscow, 123182 Russia

<sup>b</sup> Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of The Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>c</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, 199991 Russia

<sup>d</sup> Institute of Physiologically Active Substances of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

\*e-mail: mitrofanoff.yura@yandex.ru

Received August 19, 2019; revised August 19, 2019; accepted August 22, 2019

The study examined the binding of  $^{68}\text{Ga}$  to two organic ligands containing aminodiphosphonic groups: 1,7-diamino-4-oxaheptane-1,1,7,7-tetraphosphonic and 1,7-diamino-4-hydroxycarbonylheptane-1,1,7,7-tetraphosphonic acids. The stability and osteotropic potential of the labeled compounds were evaluated.

**Keywords:**  $^{68}\text{Ga}$ , diphosphonates, aminodiphosphonic acids, osteotropic radiopharmaceuticals, hydroxyapatite