УДК 546.47+615.017+54-02+547.7+57.085.23

Комплекс $^{69m}ZnLigCl_2$ (Lig — *N*-(5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин-2-ил) бензамид) как потенциальный фармпрепарат

М. А. Орлова,[а,б] Т. П. Трофимова,[а,в] А. П. Орлов,[а] И. А. Иванов,[а] А. В. Северин,[а] Г. Ю. Алешин,[а] С. С. Белышев,[г] А. Н. Васильев,[а] С. Н. Калмыков[а,д]*

[а]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Химический факультет, Российская Федерация, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3.
E-mail: orlova.radiochem@mail.ru
[б]Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Российская Федерация, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1
[в]Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Российская Федерация, 142432 Черноголовка Московской обл., Северный пр-д, 1
[г]Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д. В. Скобельцына, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Российская Федерация, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2
[д]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Российская Федерация, 123098 Москва, пл. Акад. Курчатова, 1

Рассмотрена цитотоксичность комплекса $^{69m}ZnLigCl_2$ (Lig — *N*-(5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин-2-ил)бензамид) по отношению к клеточной линии K-562 (хронический миелолейкоз) в сравнении с клетками здоровых доноров. Получен и охарактеризован методами ТСХ и авторадиографии комплекс $^{69m}ZnLigCl_2$. Исследована кинетика сорбции цинка на гидроксиапатите.

Ключевые слова: изотоп цинк-69m, производные дигидротиазина, гидроксиапатит, K-562.

Основным методом лечения острых лейкозов у детей является полихимиотерапия, т.е. одновременное использование нескольких химпрепаратов, различающихся по механизму действия на клеточный цикл. Однако применение лучевой терапии также дает хорошие результаты. Показано[1], что радиофармпрепараты (РФП) ^{213}BiHuM195 или ^{225}AcHuM195 (HuM195 — антитела линтузумаб (lintuzumab) к CD33 (трансмембранному рецептору на поверхности клеток острого миелоидного лейкоза)) обладают высокой цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам за счет воздействия высокоэнергетического α-излучения. Изотоп ^{213}Bi с периодом полураспада 45 мин, который можно получать из генератора ^{225}Ac($T_{1/2}$ = = 10 суток)/^{213}Bi со сроком эксплуатации ~1 месяц, представляет особый интерес. В результате распада образуются короткоживущие α-, β- и γ-излучатели[2], а на конечной стадии — изотопы ^{213}Po с очень коротким периодом полураспада ($T_{1/2}$ = 4.2 мкс) и высокой энергией E_a = 8.3 МэВ, а также ^{209}Tl (β^-, $T_{1/2}$ = = 2.2 мин). При введении РФП пациентам наблюдалось снижение не только циркулирующих в крови бластов, но и бластов костного мозга[3]. В настоящее время α-радиоиммунотерапия активно развивается, однако лучевую терапию можно применять не только в этом случае. Тераностика — процесс, при котором одновременно проводят и диагностику, и терапию, — один из наиболее актуальных методов современной медицины[4,5]. Дизайн таких РФП должен изменяться в зависимости от заболевания и необходимых исследований, а это требует большого разнообразия составов РФП. В частности, их дизайн может включать транспортер и терапевтическую/диагностическую компоненты, как, например, было предложено в работе[6]. Цинк перспективен для участия в такой связке, поскольку легко переносится по организму, имеет индивидуальные сайты связывания на альбумине и металлотионеинах (кроме того, существуют семейства транспортеров ZnT и ZIP), а также, как показали последние исследования комплексов с лигандами аминопиримидином и аминопиримидинсалицилатом[7], может проникать в хелатированном виде в клетку даже при небольших концентрациях. Среди короткоживущих изотопов цинка следует выделить ^{69m}Zn, ^{71m}Zn и ^{62}Zn. Отдельные попытки их применения в медицинских целях[8—10] не были завершены. Наиболее перспективным среди этих изотопов является ^{69m}Zn, характеризующийся $T_{1/2}$ = 13.7 ч. Поскольку данный изотоп представляет собой гамма-излучатель, он может служить для диагностики опухолей, а при целевой доставке в больной орган способен к терапевтическому действию. В настоящее время гамма-излучатели не приняты в качестве терапевтических агентов, но в ряде случаев (в частности, при

© 2017 «Известия Академии наук. Серия химическая»

высокой степени метастазирования, большом объеме опухоли и др.) они могут быть полезны.

В качестве биодеградируемой подложки для изотопов и их соединений удобно применять гидроксиапатит (ГАП), получаемый в различных модификациях и не обладающий цитотоксичностью в используемых концентрациях[11]. При этом цинк можно связывать с ГАП как путем введения ионов металла при синтезе самого ГАП, так и в результате сорбции на уже готовые нанокристаллы носителя.

Среди лигандов, способных к терапевтическому антиопухолевому воздействию, следует выделить ингибиторы не только тирозинкиназ (которые широко применяются в медицинских протоколах), но и NO-синтаз, особенно ингибиторы индуцибельной изоформы iNOS,[6] гиперэкспрессируемой в ряде раков. Ранее[12] было описано антилейкемическое действие производных дигидротиазина, являющихся ингибиторами NOS различной силы (в зависимости от строения), и был получен комплекс цинка с *N*-(5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин-2-ил)бензамидом[7]. В настоящей работе синтезирован и исследован его радиоактивный аналог.

Экспериментальная часть

Изотоп ^{69m}Zn получали по фотоядерной реакции ^{71}Ga(γ,np)^{69m}Zn на разрезном микротроне с использованием пучка фотонов, образовавшихся при торможении электронов с энергией 55 МэВ, и выделяли методами экстракции и ионной хроматографии, как описано ранее[7]. Выход составлял 60%, радионуклидная чистота — 98%.

Неактивный комплекс $ZnLigCl_2$ (Lig — *N*-(5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин-2-ил)бензамид) синтезировали по методике, описанной ранее[7]. Для синтеза меченого соединения проводили изотопный обмен в течение 0.5 (**1**) и 1 ч (**2**) комплекса $ZnLigCl_2$ в растворе физиологический раствор—этиловый спирт (1 : 1) с предварительно упаренным раствором, содержащим ^{69m}Zn без носителя, который получен с хроматографической колонки.

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Аликвоты радиоактивных веществ (после изотопного обмена) помещали на пластины Silufol, используя в качестве элюента ацетон. Для контроля R_f проводили ТСХ неактивного комплекса (R_f = 0.65), лиганда (R_f = 0.58) и $ZnCl_2$ (R_f = 0.46). Проявление неактивной хроматограммы осуществляли парами иода.

Авторадиография (АРГ). Пластину после ТСХ с радиоактивными веществами характеризовали с помощью цифровой АРГ, используя запасающие пластины (Storage Phosphor System), покрытые BaFBr:Eu («Perkin—Elmer») и прибор для сканирования «Cyclone Plus» («Perkin—Elmer»)[13].

Сорбция цинка на гидроксиапатите (ГАП). Для исследования кинетики сорбции использовали растворы с $[Zn^{2+}]$ = = 0.6 и 1.6 г·л$^{-1}$, к которым добавляли 5%-ную суспензию ГАП (или ГАП$_T$ — водную суспензию ГАП, подвергнутую тепловой обработке при 95 °C в течение 4—5 ч). Реакционную массу активно перемешивали 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240 и 1440 мин. Затем осадок отделяли центрифугированием, отбирали аликвоту жидкой фракции и вносили в нее азотную кислоту до достижения концентрации 2% для дальнейшего определения концентрации ионов цинка, которую измеряли методом ICP-AES («Optima 2100 DV», «Perkin—Elmer», США).

Изотерму адсорбции изучали в диапазоне равновесных концентраций ионов цинка 0.01—1.8 г·л$^{-1}$. Порядок проведения эксперимента аналогичен представленному выше. Для каждой точки изотермы брали один и тот же объем суспензии ГАП или ГАП$_T$, добавляли одинаковый объем раствора цинка с различной исходной концентрацией ионов металла (соотношение твердой и жидкой фазы в эксперименте было постоянным) и перемешивали в течение времени, заведомо превышающего время выхода кинетической кривой сорбции на плато. По окончании эксперимента фазы разделяли центрифугированием, и концентрации ионов цинка определяли способом, указанным выше. Опыты проводили при комнатной температуре.

Морфологию образующихся нанокристаллов изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ, электронный микроскоп «Jeol JEM_1011B», Япония, разрешение 0.3 нм). Образцы готовили путем нанесения на специальную медную сетку с формваровой пленкой капли суспензии изучаемых кристаллов, разбавленной водой в соотношении 30 : 1.

МТТ-тест. Исследование цитотоксичности проводили методом МТТ-теста[14,15] на клеточной линии K-562 (линия хронического миелоидного лейкоза) в сравнении с лимфоцитами здоровых доноров (ЗД).

Обсуждение полученных результатов

Результаты АРГ пластин после ТСХ для комплекса $^{69m}ZnLigCl_2$, меченного цинком-69m при разных временах изотопного обмена, представлены на рисунке 1. Для соединения **1** значение R_f 0.65 совпадает с контрольной величиной, полученной для неактивного комплекса. Для соединения **2** R_f 0.55. Поскольку комплекс $LigZnCl_2$, как было показано ранее[7], в некоторых средах не очень устойчив, можно полагать, что при времени изотопного обмена 1 ч начинают происходить изменения в его составе. Следовательно, время изотопного обмена следует ограничить периодом 0.5 ч.

Величины выживаемости клеточной линии K-562 под действием лиганда и неактивного комплекса в сравнении с простыми солями цинка (хлоридом и салицилатом) и комплексом цинка с 2-аминопиримидинсалицилатом приведены в таблице 1. Лиганд LigHBr обладает малой цитотоксичностью по отношению к нормальным лимфоцитам. Его комплекс $ZnLigCl_2$ более цитотоксичен к клеткам здоровых доноров, но значение LC_{50} комплекса по отношению к клеточной линии K-562 практически не отличается от LC_{50} лиганда, что понижает величину ТИ в ~2 раза. Комплекс цинка с 2-аминопиримидинсалицилатом проявляет бóльшую цитотоксичность и к здоровым, и к лейкемическим клеткам, чем $ZnLigCl_2$, а величины ТИ у этих комплексов совпадают. Известно, что введение цинка во многих случаях вызывает увеличение цитотоксичности по отношению к раковым клеткам (в том числе, и лейкемическим), однако для клеточной линии K-562 этого не наблюдается, что, по-видимому, характеризует ее специфичность по отношению к цинку. Эти клетки оказались более чувствительными к введению салицилат-ионов.

Как показано нами ранее[7], сам лиганд практически не сорбируется на ГАП и, следовательно, комплекс

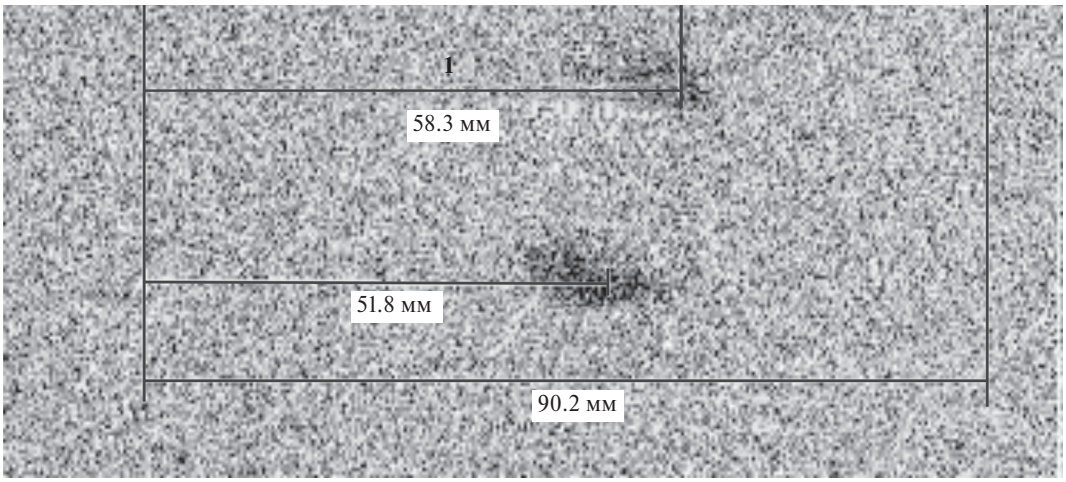

Рис. 1. Авторадиография ТСХ с комплексом $ZnLigCl_2$ после изотопного обмена в течение 0.5 (**1**) и 1 ч (**2**); R_f = 0.65 и 0.55 соответственно.

Таблица 1. Выживаемость (LC_{50}) клеток линии K-562 под действием различных соединений

Соединение*	LC_{50}/мкмоль · мл$^{-1}$		ТИ**
	ЗД	K-562	
$ZnCl_2$	1.6±0.3	0.52±0.05	3
$ZnSal_2(H_2O)_2$ (см. лит.[16])	0.68±0.06	0.41±0.05	1.7
Zn $(AP)_2Sal_2$ (см. лит.[7])	1.0±0.2	0.25±0.04	4
LigHBr	10.6±0.5	1.0±0.3	10.6
$ZnLigCl_2$	4.5±0.4	1.1±0.2	4

* Sal — салицилат, AP — аминопиридин. ** Терапевтический индекс, равный LC_{50}(ЗД)/LC_{50}(лейкемические клетки).

может связываться с ГАП только через цинк. Поэтому мы рассмотрели процесс сорбции цинка на наночастицах ГАП и ГАП$_T$, который определяется[17] процессами ионного обмена, комплексообразования на поверхности, замещения кальция и переосаждения за счет растворения ГАП. Особенно важно комплексообразование, протекающее в значительной степени за счет образования связей RP—OMe$^+$ без изменения морфологии и формирования вторичных твердых фаз[18,19].

Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью моделей, аналогичных моделям изотерм сорбции Ленгмюра

$$\Gamma = \Gamma_m k C_e/(1 + kC_e),$$

или в линеаризованном виде

$$C_e/\Gamma = 1/(\Gamma_m k) + C_e/\Gamma_m,$$

и Фрейдлиха:

$$\Gamma = k_f C_e^{1/n},$$

или в линеаризованном виде

$$\lg\Gamma = \lg k_f + n^{-1}\lg C_e,$$

где приведенная концентрация (или адсорбция) $\Gamma = V(C_0 - C_e)/m$, Γ_m — максимальная сорбционная емкость, мг(Zn^{2+})/г(ГАП); k — адсорбционный коэффициент, л · мг$^{-1}$; C_0 — исходная концентрация цинка, мг · л$^{-1}$; C_e — равновесная концентрация цинка, мг · л$^{-1}$; m — масса сорбента, г; k_f и n — константы уравнения Фрейдлиха.

Данные по кинетике сорбции в системах цинк—ГАП и цинк—ГАП$_T$ представлены на рисунке 2. Стационарное состояние достигается после сорбции в течение 90 мин (при различных начальных концентрациях ионов цинка) для сорбента ГАП и уже через 10 мин для сорбента ГАП$_T$. Минимальное время проведения экспериментов по изотерме сорбции, исполь-

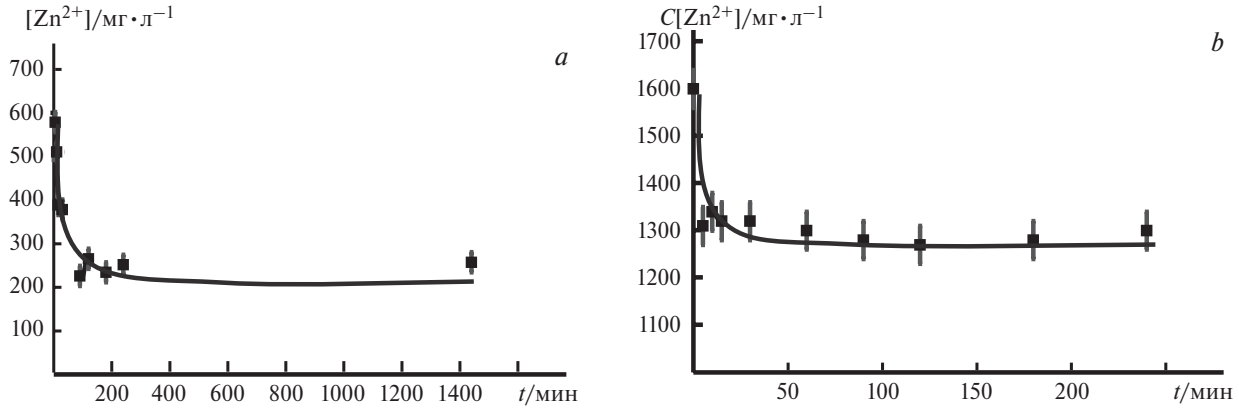

Рис. 2. Кинетика сорбции ионов цинка на ГАП (*a*) и ГАП$_T$ (*b*).

зованное в работе, составило 90 мин для обоих сорбентов. Полученные изотермы сорбции приведены на рисунках 3, *a* и 4, *a*. Представленные на рисунках кривые обработаны с применением моделей Ленгмюра (рис. 3, *b* и 4, *b*) и Фрейдлиха (рис. 3, *c* и 4, *c*). Экспериментально найденные параметры этих уравнений представлены в таблице 2. Максимальная сорбционная емкость Γ_m оказалась меньше для ГАП$_T$, что согласуется с данными ПЭМ (рис. 5) и значениями свободной удельной поверхности образцов суспензий обоих типов. Хотя размеры кристаллов после термической обработки уменьшаются, их форма становится более правильной изометричной (в том числе существенно увеличивается их толщина), что приводит к уменьшению их удельной поверхности и, как следствие, уменьшению максимальной адсорбции. В суспензии чистого ГАП нанокристаллы представляют собой агрегаты из более мелких частиц, границы между которыми активно участвуют в сорбционных процессах. После термической обработки происходит процесс перекристаллизации (оствальдово созревание), при этом границы между частицами в агрегатах заполняются с образованием псевдомонокристаллов ГАП$_T$, у которых площадь активной боковой поверхности существенно уменьшена. Если предположить, что ионы цинка преимущественно адсорбируются на активную боковую поверхность, то становится понятно, почему в случае ГАП$_T$ равновесие достигается быстрее: меньше сама поверхность и отсутствуют границы блоков в кристалле, по которым сорбция протекает медленнее.

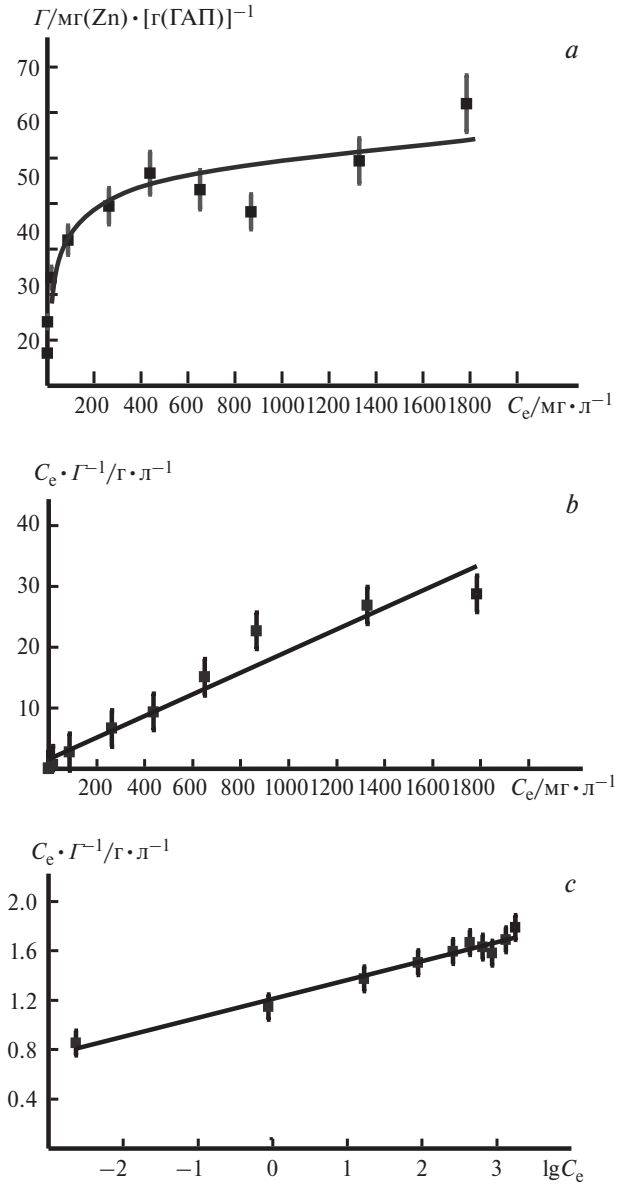

Рис. 3. Изотерма сорбции на ГАП (*a*) и ее обработка (линеаризация) с помощью моделей Ленгмюра (*b*) и Фрейдлиха (*c*).

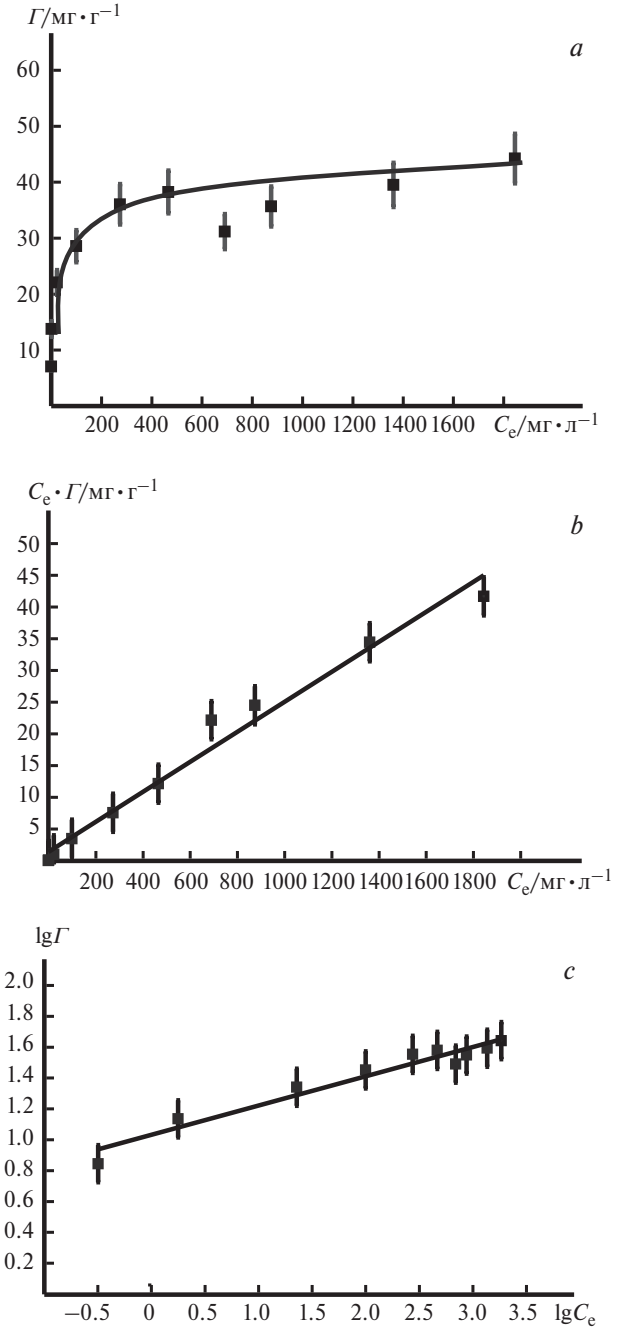

Рис. 4. Изотерма сорбции на ГАП$_T$ (*a*) и ее обработка (линеаризация) с помощью моделей Ленгмюра (*b*) и Фрейдлиха (*c*).

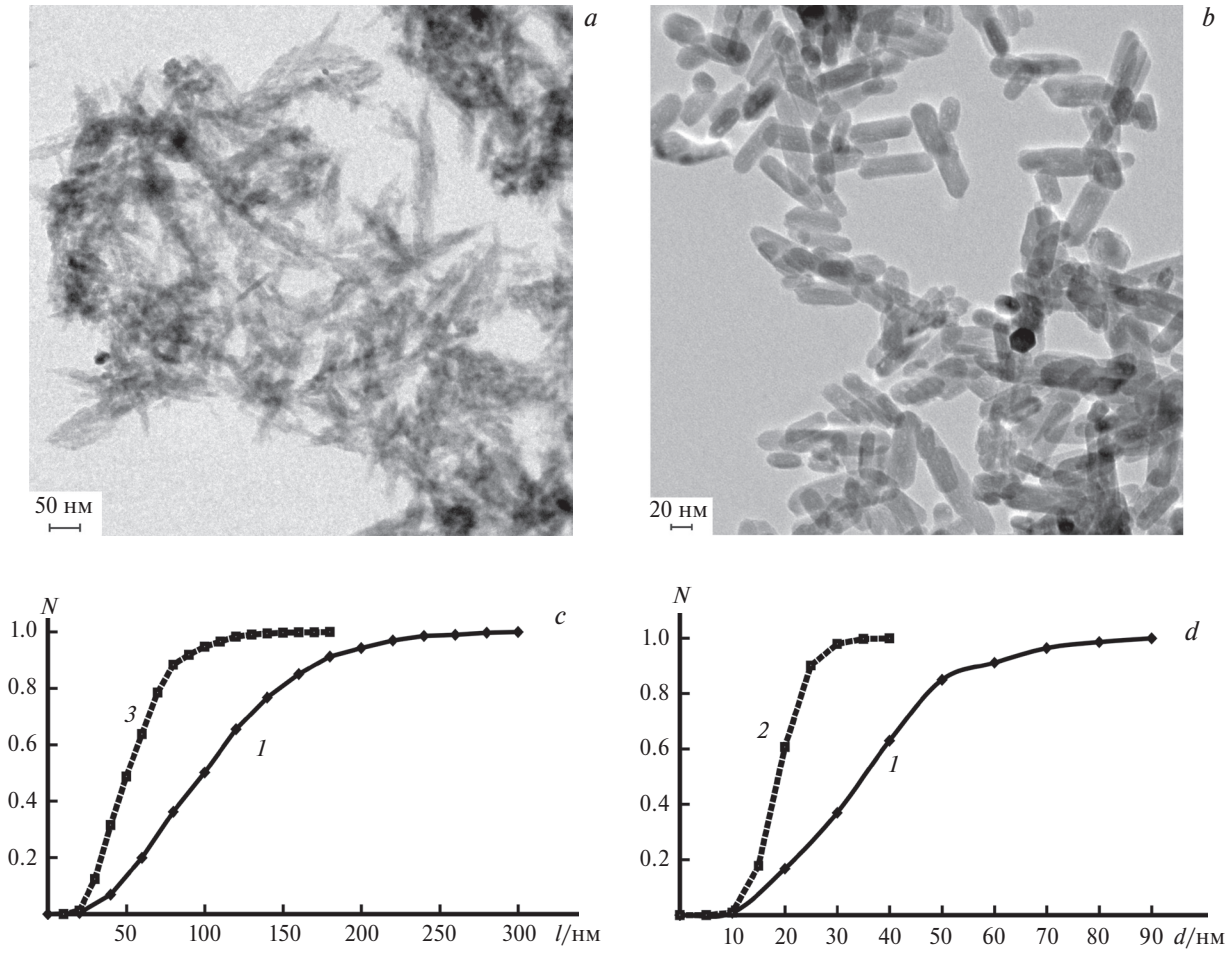

Рис. 5. Полученные методом ПЭМ микрофотографии частиц ГАП (*a*) и ГАПТ (*b*), а также их функции распределения по длине (*c*) и ширине (*d*): ГАП (1), ГАПТ (2).

Таблица 2. Экспериментально найденные основные параметры уравнений Ленгмюра и Фрейдлиха

Сорбент	Γ_m/мг · г$^{-1}$	$K \cdot 10^2$/л · мг$^{-1}$	k_f	n
ГАП	56.2±6	1.1±0.1	16.4±1.5	6.5±0.5
ГАП$_T$	42.4±5	1.7±0.1	10.8±0.8	5.2±0.4

В целом полученные величины коррелируют с данными литературы[17,19—22].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-08-00139).

Список литературы

1. T. L. Rosenblat, M. R. McDevitt, D. A. Mulford, N. Pandit-Taskar, C. R. Divqi, K. S. Panageas, M. L. Htaney, S. Morgenstem, A. Sgouros, S. M. Larson, D. A. Scheinberg, J. G. Jurcic, *Clin. Cancer Res.,* 2010, **16**, 5303.
2. J. G. Jurcic, S. M. Larson, G. Sgouros, M. R. McDevitt, R. D. Finn, *Blood*, 2002, **100**, 1233.
3. M. Miederer, M. R. McDevitt, G. Sgouros, K. Kramer, N. K. Cheung, D. A. Scheinberg, *J. Nucl. Med.*, 2004, **45**, 129.
4. В. И. Чернов, О. Д. Брагина, И. Г. Синилкин, А. А. Медведева, Р. В. Зельчан *Вестн. рентгенологии и радиологии*, 2016, **97**, 306.
5. M. R. McDevitt, D. Ma, J. Simon, R. K. Frank, D. A. Scheinberg, *Appl. Radiat. Isot.*, 2002, **57**, 841.
6. M. A. Orlova, T. P. Trofimova, R. A. Aliev, A. P. Orlov, S. V. Nikulin, A. N. Proshin, S. N. Kalmykov. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2017, **311**, 1177.
7. А. П. Орлов, Т. П. Трофимова, Е. Ю. Осипова, А. Н. Прошин, М. А. Орлова, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2017, 1860 [A. P. Orlov, T. P. Trofimova, E. Yu. Osipova, A. N. Proshin, M. A. Orlova, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2017, **66**, 1860].
8. M. Molokhia, G. Sturniolo, R. Shields, L. A. Turnberg, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980, **33**, 881.
9. H. T. Wolterbeek, A. J. M. van der Meer, *Sci. Total Envir.*, 2002, **287**, 13.
10. A. Takeda, H. Tamano, N. Oku, *Brain Res.,* 2003, **965**, 170.
11. А. В. Северин, М. А. Орлова, Е. С. Шаламова, Т. П. Трофимова, И. А. Иванов, *Изв. АН. Сер. хим.,* 2017, 9 [A. V. Severin, M. A. Orlova, E. S. Shalamova, T. P. Trofimova, I. A. Ivanov, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2017, **66**, 9].
12. М. А. Орлова, Т. П. Трофимова, С. В. Никулин, А. П. Орлов, *Вестн. Моск. ун-та*, 2016, **57**, 269—275 [M. A. Orlova, T. P. Trofimova, S. V. Nikulin, A. P. Orlov, *Mosc. Univ. Chem. Bull.* (*Engl. Transl.*), 2016, **71**, 258].
13. Р. А. Алиев, Г. Ю. Алешин, С. С. Белышев, Б. С. Ишханов, А. Б. Приселкова, В. В. Ханкин, В. Ю.

Пожарская, М. А. Орлова, С. Н. Калмыков, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2017, 368 [R. A. Aliev, G. Yu. Aleshin, S. S. Belyshev, B. S. Ishhanov, A. B. Priselkova, V. V. Hankin, V. Yu. Pozharskaya, M. A. Orlova, S. N. Kalmykov, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2017, **66**, 368].
14. S. Schweizer, *Phys. Stat. Sol. (a)*, 2001, **187**, 335.
15. A. J. P. Veerman, R. Pieters, *Br. J. Haematol.*, 1990, **74**, 381.
16. А. П. Орлов, М. А. Орлова, Т. П. Трофимова, Е. Ю. Осипова, А. Н. Прошин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2016, 1879 [A. P. Orlov, M. A. Orlova, T. P. Trofimova, E. Yu. Osipova, A. N. Proshin, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2016, **65**, 1879].
17. М. А. Орлова, Е. Ю. Осипова, С. А. Румянцев, С. П. Ашурко, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2012, 403 [M. A. Orlova, E. Yu. Osipova, S. A. Rumyantsev, S. P. Ashurko, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2012, **61**, 405].
18. X. Yuplng, W. Franklln, *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**, 1472.
19. M. Motskin, D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter, J. N. Skepper, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3307.
20. A. Corami, S. Mignardi, V. Ferrini, *J. Hazardous Mater.*, 2007, **146**, 164.
21. S. Meski, S. Ziani, H. Khireddine, S. Boudboub, *J. Hazardous Mater.*, 2011, **186**, 1007.
22. Z. Elouear, J. Bouzid, N. Boujelben, M. Feki, F. Jamoussi, A. Montiel, *J. Hazardous Mater.*, 2008, **156**, 412.

Поступила в редакцию 29 августа 2017;
после доработки — 5 октября 2017;
принята к публикации 14 декабря 2017