МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

АЛЕШИН ГЛЕБ ЮРЬЕВИЧ

Комплексы Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+} с азакраун-эфирами как потенциальные компоненты радиофармпрепаратов

02.00.14 – радиохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории радиофармацевтической химии кафедры радиохимии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научные руководители

Калмыков Степан Николаевич – доктор химических наук, член-корреспондент РАН

Егорова Байирта Владимировна – кандидат химических наук

Официальные оппоненты

Соболев Александр Сергеевич – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, МГУ имени М.В.Ломоносова, профессор кафедры биофизики биологического факультета

Эпштейн Наталья Борисовна – доктор фармацевтических наук, доцент, Обнинский институт атомной энергетики — ИАТЭ НИЯУ МИФИ, заведующая кафедрой фармацевтической и радиофармацевтической химии

Кодина Галина Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, заведующая отделом радиационных технологий медицинского назначения

Защита диссертации состоится «26» августа 2020 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.11 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 10, кафедра радиохимии, аудитория 308.

E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (А.В. Северин, ученый секретарь диссертационного совета МГУ.02.11)

aleshin@radio.chem.msu.ru (Г.Ю. Алешин, соискатель)

С диссертацией, а также со сведениями о регистрации участия в удаленном интерактивном режиме в защите можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: http://istina.msu.ru/dissertations/258218321

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук Северин Александр Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Ионизирующее излучение, сопровождающее радиоактивный распад ядер, стало применяться в медицинских целях практически с момента открытия радиоактивности. Так, регистрация γ-излучения в связи с его высокой проникающей способностью используется в современных методах молекулярной визуализации, таких как ПЭТ и ОФЭКТ. В то же время корпускулярные α- и β^--излучения, характеризующиеся высокой линейной передачей энергии, используются для терапии злокачественных новообразований. Данный вид терапии может конкурировать с методами внешней лучевой и брахитерапии, так как введение источника ионизирующего излучения непосредственно в организм в сочетании с методами направленной доставки препарата позволяет оказывать локальное деструктивное действие только на злокачественное образование, минимизируя при этом воздействие на здоровые органы и ткани. Таким образом, синтез новых радиофармпрепаратов, в том числе с целью ранней диагностики и направленной терапии онкологических болезней, является одной из важных направлений развития ядерной медицины и снижения смертности от социально-значимых заболеваний.

В большинстве случаев для использования радионуклида в медицинских целях требуется конъюгация его с биологическим вектором для направленной доставки в исследуемую область или пораженную ткань. Однако непосредственное связывание с вектором чаще всего не приводит к образованию устойчивого соединения, поэтому для связывания радионуклидов, представляющих собой катионы металлов, используют бифункциональные лиганды, образующие устойчивые комплексы с катионом радионуклида, и одновременно ковалентно связанные с молекулой, отвечающей за направленную доставку препарата.

При разработке новых соединений для ядерной медицины необходимо учитывать несколько факторов, влияющих на качество препарата. Так, радионуклид должен быть связан в соединение, устойчивое *in vivo*. В противном случае он будет накапливаться в здоровых органах и тканях в результате диссоциации комплекса и тем самым затруднять проведение диагностического исследования или создавать значительные побочные эффекты при терапии. Кроме того, учитывая короткий период полураспада медицинских радионуклидов, синтез радиофармпрепаратов должен быть экспрессным для минимизации потерь радиоактивности до инъекции препарата; при этом использование биологических векторов зачастую исключает использование повышенных температур для ускорения реакции комплексообразования. Оптимальное сочетание этих факторов на данный момент не вполне достигнуто: большинство рассматриваемых в литературе макроциклических лигандов характеризуются низкой скоростью образования комплекса, в то время как координационные соединения с ациклическими лигандами, несмотря на высокую скорость образования комплекса, также не являются оптимальными из-за диссоциации образуемых соединений после инъекции и перехелатирования радионуклида белками крови. Среди макроциклических лигандов наиболее хорошо изучен с целью применения в ядерной медицине 1,4,7,10-тетраазадодекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA) и его производные. В то же время, информации о применении в радиофармпрепаратах макроциклических лигандов с бóльшим количеством

гетероатомов и размером полости в литературе крайне мало, несмотря на имеющиеся для них сведения о лучшей по сравнению с DOTA кинетикой комплексообразования.

Использование одного и того же конъюгата одновременно в диагностических и терапевтических целях позволяет непосредственно отслеживать доставку и накопление препарата и оценивать эффективность лечения. Такой подход, называемый тераностикой, требует либо использования радионуклидов, ядерно-физические свойства которых подходят для обеих целей (например, ^{67}Cu), либо образования устойчивых хелатных соединений как с диагностическими (как правило, элементы 4–5 периодов), так и с терапевтическими радионуклидами (в случае α-излучателей – как правило тяжелые металлы 6 периода). Тем самым тераностика требует универсальности лиганда и образования устойчивых комплексов с элементами, имеющими различную координационную химию.

Изотопы меди ^{61}Cu, ^{62}Cu, ^{64}Cu и ^{67}Cu и их комплексы весьма интенсивно изучаются с целью их применения как в ПЭТ и ОФЭКТ, так и для β^--терапии. В то же время, соединения цинка весьма слабо изучены с точки зрения их применения в ядерной медицине, несмотря на подходящие для диагностики ядерно-физические характеристики некоторых его изотопов (^{62}Zn, ^{63}Zn, ^{69m}Zn), в том числе в качестве *in vivo* генератора медицинских изотопов меди. Кроме того, в последние годы в клинических исследованиях высокую эффективность демонстрирует таргетная альфа-терапия, в связи с чем особое внимание уделяется альфа-излучателям, включая изотопы ^{212}Bi и ^{213}Bi. Данные радионуклиды также являются удобными для применения в клинической практике в связи с генераторным способом получения.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является определение устойчивости комплексов Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+} с производными азакраун-эфиров для получения радиофармпрепаратов в модельных условиях и в биологически значимых средах.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- Разработка методик выделения радионуклидов ^{67}Cu, ^{65}Zn, ^{69m}Zn из продуктов облучения металлических мишеней на ускорителях заряженных частиц.
- Определение кажущихся констант устойчивости комплексов Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+} с лигандами L1, L2 и L3 (рис. 1)
- Определение оптимальных условий комплексообразования радионуклидов Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+} с исследуемыми лигандами.
- Исследование устойчивости изучаемых комплексов в сыворотке крови *in vitro*.
- Изучение стабильности наиболее устойчивых комплексов в условиях *in vivo*.

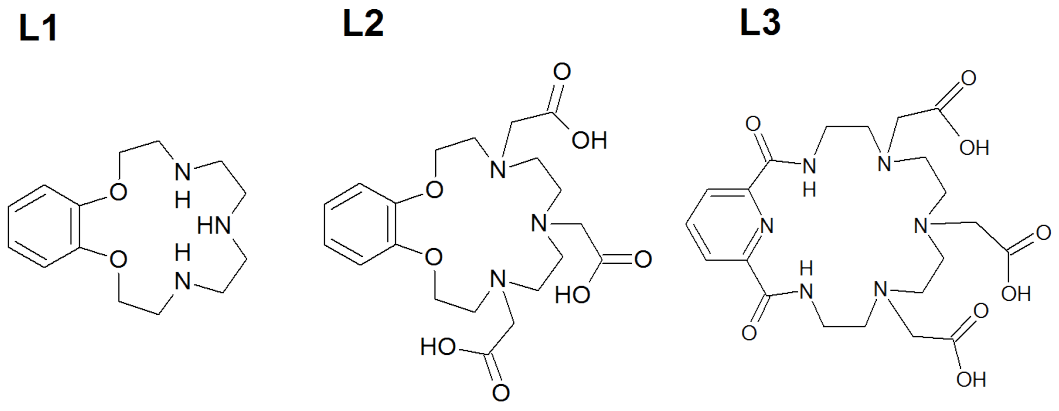

Рисунок 1. Лиганды L1, L2 и L3, использованные в работе

Научная новизна

- Разработаны методики выделения ^{67}Cu, ^{65}Zn и ^{69m}Zn из облученных на ускорителях частиц цинковой, медной и галлиевой металлических мишеней.
- Впервые определены значения констант протонирования для лигандов L1 и L2, а также стехиометрии и константы устойчивости их комплексов с Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+}.
- Получены данные об условиях образования комплексов изучаемых лигандов с Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+}, а также об их поведении в среде сывороточных белков крови. Сделан вывод об устойчивости комплексов ZnL2, ZnL3, BiL2 и BiL3 в присутствии сывороточных белков, а также об отсутствии значимой связи между константами устойчивости и стабильностью рассматриваемых комплексов *in vitro*.
- Впервые получены данные о распределении комплексов ZnL2, ZnL3, BiL2 и BiL3 в организме лабораторных мышей. Установлено, что комплексы ZnL2 и BiL3 стабильны *in vivo* как минимум в течение 6 часов. Комплексы ZnL2 и BiL3 могут в дальнейшем рассматриваться как потенциальные компоненты радиофармпрепаратов.

Практическая и теоретическая значимость работы

Полученные в ходе данной работы результаты могут быть использованы при разработке радиофармпрепаратов – меченных биоконъюгатов изучаемых лигандов с пептидными векторами как для диагностических, так и для терапевтических целей. Кроме того, данные об устойчивости изученных комплексов могут быть использованы при поиске новых макроциклических лигандов для ядерной медицины.

Достоверность результатов обеспечена использованием современных расчетных и инструментальных **методов анализа** (гамма-спектрометрия, жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия, авторадиография, спектроскопия ядерно-магнитного резонанса, рентгеноструктурный анализ и другие), высокой воспроизводимостью результатов, статистической оценкой погрешностей и сходимости результатов измерений.

Положения, выносимые на защиту

- Методики выделения ^{67}Cu, ^{65}Zn и ^{69m}Zn из продуктов облучения цинковой, медной и галлиевой металлических мишеней.
- Величины констант протонирования L1 и L2 и константы комплексообразования CuL1, CuL2, ZnL1, ZnL2, BiL1 и BiL2.
- Условия образования меченных комплексов Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+} с L1, L2 и L3.
- Данные об устойчивости комплексов Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+} с L1, L2 и L3 в сыворотке крови.
- Данные о распределении комплексов ZnL2, ZnL3, BiL2 и BiL3 в организме лабораторной мыши, устойчивость комплексов ZnL2 и BiL3 *in vivo*.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключался в критическом анализе литературы, участии в формулировке цели и задач исследования, проведении экспериментов по определению констант протонирования лигандов и устойчивости комплексов, участии в разработке методик выделения радионуклидов меди и цинка, переработке облученных мишеней, отработке методик определения радиохимической чистоты исследуемых комплексов, проведении экспериментов по анализу устойчивости комплексов в сыворотке крови, проведении экспериментов на лабораторных животных, обработке, обобщении и систематизации результатов, участии в подготовке публикаций. Отдельные исследования проводились студентами Л.С. Замуруевой и С.Ю. Хабировой в рамках курсовых и дипломной работ, у которых автор данной диссертации являлся научным руководителем.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены в виде докладов на следующих конференциях: International Symposium on Metal Complexes (ISMEC) 2019 (Дебрецен, Венгрия, 11-14 июня 2019), The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research (Москва, Россия, 24-25 сентября 2018), IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018» (Санкт-Петербург, Россия, 17–21 сентября 2018), 13th International Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds (Прага, Чехия, 3-7 июня 2018). Всего по материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI), и 6 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения в шести главах, выводов, списка литературы и приложений. Список цитируемой литературы включает 196 наименований. Диссертация изложена на 134 страницах, содержит 60 рисунков и 12 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении кратко обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель и задачи исследования, указана научная новизна и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы (глава 1) рассмотрены теоретические основы диагностических и терапевтических методов ядерной медицины (в том числе требования к используемым радионуклидам), характеристики основных лигандов, рассматриваемых с целью их применения в ядерной медицине, а также приведены примеры исследований радиофармпрепаратов на основе комплексов меди, цинка и висмута для диагностики и терапии заболеваний.

В экспериментальной части (глава 2) описаны используемые материалы, в том числе лиганды L1, L2 и L3 (синтезированы в ИНЭОС РАН, лаборатория фотоактивных и супрамолекулярных систем), инструментальные и расчетные методы, в том числе методы определения констант устойчивости комплексов, условия облучения металлических мишеней и выделения радионуклидов, определения устойчивости *in vitro* и проведения экспериментов *in vivo*.

Обсуждение результатов разделено на 5 глав, посвященных выделению радионуклидов меди и цинка (глава 3), определению констант устойчивости комплексов (глава 4), определению условий образования меченых комплексов (глава 5), анализу устойчивости комплексов *in vitro* (глава 6), анализу структуры комплексов цинка и висмута (глава 7) и устойчивости комплексов *in vivo* (глава 8).

Выделение радионуклидов меди и цинка из облученных металлических мишеней

В рамках данной работы проводилось выделение радионуклидов ^{64}Cu (методика разделения описана в работе [7]), ^{67}Cu, ^{65}Zn и ^{69m}Zn из облученных металлических мишеней природного изотопного состава (обеспечение работы ускорителей частиц при облучении мишеней обеспечивалось сотрудниками НИИЯФ МГУ). Условия получения и выделения радионуклидов приведены в табл. 1. В случае выделения ^{69m}Zn требовалась предварительная экстракция избытка галлия метилизобутилкетоном в связи с присутствием макроколичеств Ga^{3+} в растворе (масса металлической мишени составляла около 4 граммов) и, в то же время, крайне незначительных химических количеств Zn^{2+} в растворе. При получении ^{64}Cu образовывался также изотоп ^{61}Cu, однако данный радионуклид не определялся уже спустя двое суток из-за малого периода полураспада ($T_{1/2}$ = 3,3 ч). Хроматографическое выделение с использованием ионообменных смол позволило с высоким выходом получить растворы солей целевых изотопов без значимых примесей радионуклидов других элементов: радионуклидная чистота составляла более 99% (хроматограммы приведены на рис. 2).

Таблица 1. Условия наработки и выделения радионуклидов меди и цинка

Радионуклид	Мишень	Условия облучения	Ионообменная смола	Выход продукта
^{64}Cu	Ni (мет.)	p, $E_p \approx$ 7–8 МэВ	Cu-Resin	95%
^{67}Cu	Zn (мет.)	γ, $E_e \approx$ 55 МэВ	Cu-Resin	93%
^{65}Zn	Cu (мет.)	d, $E_d \approx$ 14,8 МэВ	Dowex 1x8	95%
^{69m}Zn	Ga (мет.)	γ, $E_e \approx$ 55 МэВ	Dowex 1x8	92%

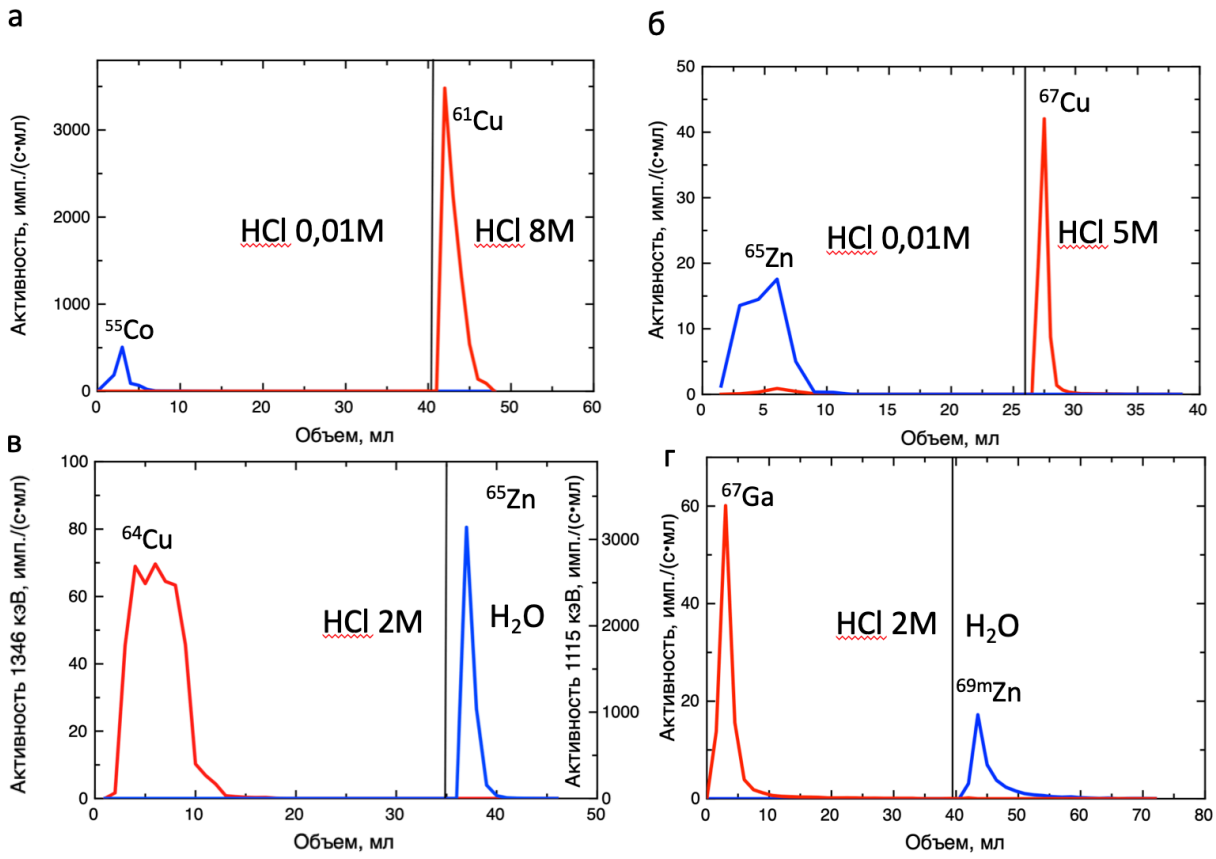

Рисунок 2. Хроматограммы выделения ^{61,64}Cu (а), ^{67}Cu (б), ^{65}Zn (в) и ^{69m}Zn (г)

Определение констант устойчивости комплексов

Определение констант протонирования лигандов и устойчивости большинства изучавшихся в данной работе комплексов определялся методом потенциометрического титрования с последующим расчетом констант с помощью программы HyperQuad. Для определения констант устойчивости комплексов лигандов с катионами металлов необходимо было в первую очередь определить константы протонирования лигандов L1 и L2, не изучавшихся ранее (табл. 2). Первые две ступенчатые константы протонирования для обоих лигандов соответствуют протонированию аминогрупп в макроцикле. Для лиганда L2 третья ступенчатая константа (lgK(L2H$_3$) = 3,5) соответствует протонированию средней аминогруппы, так как этот процесс идет при значительном избытке H^+. Значение четвертой ступенчатой константы lgK(L2H$_4$) = 2,6 характерно для протонирования карбоксильной группы.

Таблица 2. Константы протонирования L1 и L2 (полные константы *lg*β и ступенчатые *lg*K)

Равновесие	*lg*β(L1)	*lg*K(L1)	*lg*β(L2)	*lg*K(L2)
$\mathbf{L}+H^+ \rightleftarrows \mathbf{L}\cdot H^+$	9,4 ± 0,1	9,4 ± 0,1	9,9 ± 0,1	9,9 ± 0,1
$\mathbf{L}+2H^+ \rightleftarrows \mathbf{L}\cdot(H^+)_2$	17,5 ± 0,1	8,1 ±0,1	17,7 ± 0,1	7,8 ± 0,1
$\mathbf{L}+3H^+ \rightleftarrows \mathbf{L}\cdot(H^+)_3$	–	–	21,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1
$\mathbf{L}+4H^+ \rightleftarrows \mathbf{L}\cdot(H^+)_4$	–	–	23,8 ± 0,2	2,6 ± 0,2

Значения *lg*β для L1 и L2, а также ранее полученные значения констант протонирования для L3 [1] использовались для расчетов констант устойчивости комплексов (табл. 3) по результатам потенциометрического титрования (для комплексов Cu^{2+} и Zn^{2+}) и жидкость-жидкостной экстракции несвязанного катиона 0,01 М раствором ди-(2-этилгексил)фосфорной кислоты в толуоле (для комплексов висмута в связи с высокой степенью гидролиза катиона Bi^{3+} в нейтральных и щелочных средах и образования нерастворимых соединений [2]). Значения *lg*K для CuL3, ZnL3 и BiL3 были рассчитаны ранее [1,3].

Таблица 3. Значения кажущихся констант устойчивости изучаемых комплексов ($lg\beta_{ML}$)

	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Bi^{3+}
L1	15,6 ± 0,1	8,7 ± 0,1	–
L2	16,8 ± 0,1	14,9 ± 0,1	21,2 ± 0,1
L3	15,8 ± 0,1 [1]	12,6 ± 0,1 [1]	21,3 ± 0,2 [3]

Из таблицы 3 следует, что введение трех карбоксильных групп в состав лиганда увеличивает устойчивость образующихся комплексов. Полученные значения $lg\beta_{ML}$ закономерно меньше аналогичных значений констант устойчивости для комплексов с DOTA ($lg\beta_{CuDOTA}$ = 22,21, $lg\beta_{ZnDOTA}$ = 21,05 [4]) и сопоставимы с константами для комплексов с ациклическими лигандами или, в некоторых случаях, даже меньше их: например, для диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA) $lg\beta_{CuDTPA}$ = 21,0, $lg\beta_{ZnDTPA}$ = 18,8 [5]. Данный факт можно связать с меньшим влиянием макроциклического эффекта: больший размер макроцикла уменьшает уровень предорганизации структуры комплекса, в связи с чем энтропийный фактор вносит более существенный вклад в уменьшение константы равновесия реакции. Также бóльшие значения констант устойчивости для DOTA по сравнению с L1 и L2 можно связать с влиянием четвертой карбоксильной группы на хелатирование катиона металла.

Висмут не образует устойчивый комплекс с L1 из-за относительно большого ионного радиуса Bi^{3+} (1.03 Å [6]), в то время как с L2 образуется весьма устойчивое соединение вследствие наличия хелатирующих карбоксильных групп, обеспечивающих первичную координацию центрального атома.

Стоит отметить, что термодинамическая устойчивость является важным, но далеко не единственным фактором, который необходимо учитывать для комплексов, потенциально применяемых в медицинских целях, не менее важную роль играет кинетическая устойчивость

соединения *in vitro* и *in vivo*. В рамках данной работы было условно принято, что на следующей стадии исследования в условиях *in vitro* будут изучаться комплексы с константами устойчивости $lgK_{ML} \approx 10$ и более.

Определение условий образования меченых комплексов в водных растворах

Степень связывания радионуклидов лигандами в различных условиях определялась с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). В рамках данных поисковых исследований считали соединение пригодным для дальнейших исследований, если в комплекс связано ≥90% радионуклида.

На первой стадии данной части исследования определялись условия проведения ТСХ (элюент и неподвижная фаза, в которых разделение областей комплекса и свободного катиона было бы оптимальным) путем проведения серий ТСХ растворов комплексов ($c(L) = 1 \cdot 10^{-3}$ М) и незакомплексованной метки в солянокислом растворе с различными элюентами и пластинами. Оптимальные условия приведены в табл. 4.

Таблица 4. Оптимальные условия для проведения ТСХ исследуемых комплексов

Комплекс	CuL1	CuL2	CuL3	ZnL2	ZnL3	BiL2
Элюент	20%NH_4Cl: MeOH (1:1)	10%$AcONH_4$: MeOH (1:1)	10%NH_4Cl: MeOH (1:1)	10%$AcONH_4$: MeOH (1:1)	10 мМ NaOH в 0,9% NaCl	10 мМ NaOH в 0,9% NaCl
Неподвижная фаза	Силикагель	Силикагель	Целлюлоза	Силикагель	Целлюлоза	Целлюлоза

После подбора условий проводилась серия ТСХ растворов с переменной концентрацией лиганда. Согласно полученным данным практически полное связывание радионуклида лигандом во всех случаях проходило менее чем за 10 минут и оставалось постоянным в течение длительного времени, что говорит о высокой скорости образования комплексных соединений.

Для количественного определения степени связывания метки пластины разделялись в соответствии со значениями R_f комплекса и несвязанного катиона металла, после чего измерялась радиоактивность отдельных частей пластин методом гамма-спектрометрии. Полученные значения радиоактивностей использовались при расчете степени мечения. Для комплексов меди уже при концентрациях L1 и L2 $\geq 1 \cdot 10^{-4}$М степень связывания радионуклида составила больше 90% (рис. 3а). В то же время для L3 такие значения достигаются при концентрациях $\geq 3 \cdot 10^{-4}$ М, что не коррелирует со значениями констант устойчивости соответствующих комплексов. Это можно объяснить особенностью работы с меченными соединениями в сверхнизких концентрациях: количество катиона металла пренебрежимо мало, поэтому даже использование особо чистых реагентов в процессе выделения радионуклида не гарантирует в полной мере отсутствия примесных катионов, количества которых могут оказаться на несколько порядков больше количества метки.

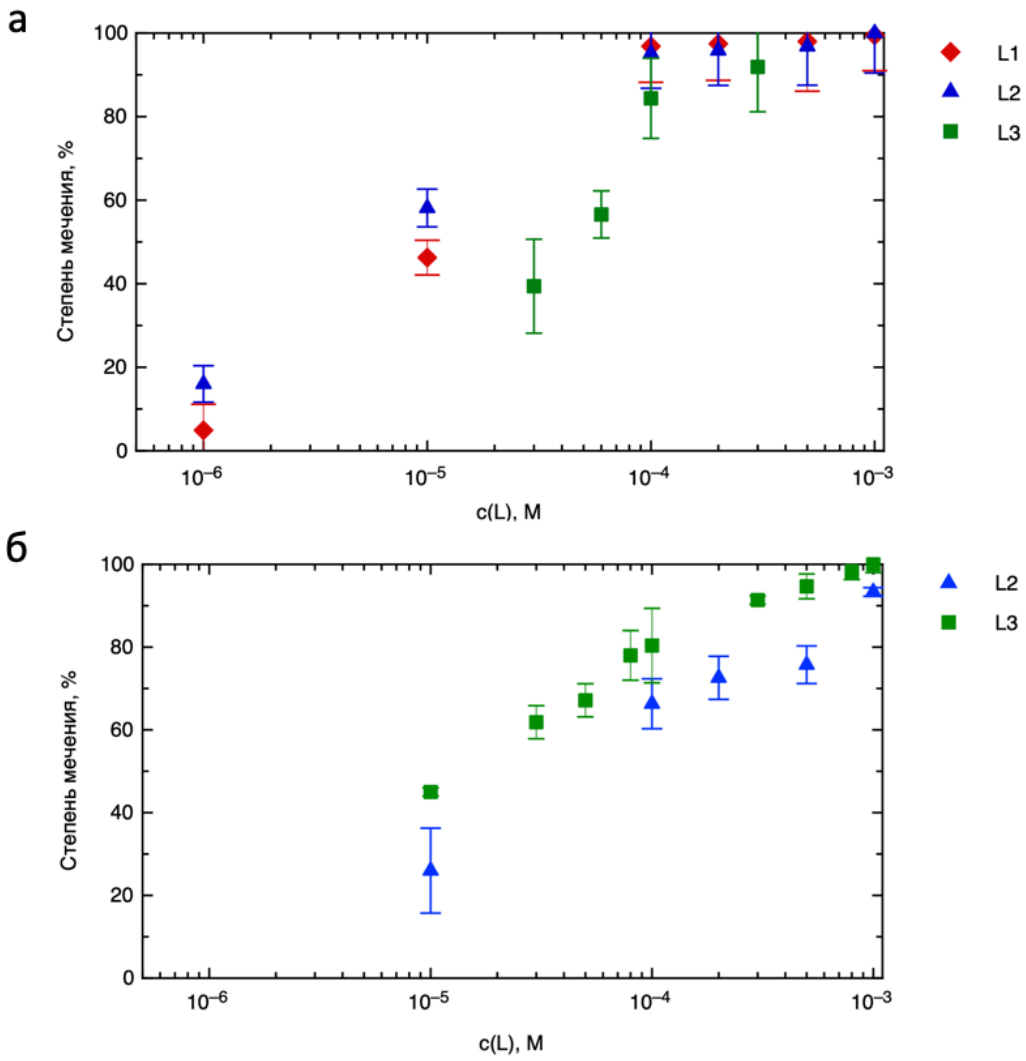

Рисунок 3. Зависимость степени мечения комплексов меди (а) и цинка (б) от концентраций лигандов

Аналогичные зависимости для комплексов цинка с L2 и L3 (рис. 3б) показывают, что данные комплексы менее стабильны при низких концентрациях, чем аналогичные комплексы меди. Однако, при концентрациях, близких к $1 \cdot 10^{-3}$М достигаются высокие значения степени мечения, что позволяет считать данные комплексы подходящими для дальнейших исследований. Стоит отметить также, что выход реакции комплексообразования L3 с катионом цинка выше, чем L2 при тех же концентрациях, несмотря на более низкие значения констант устойчивости. Последнее в совокупности с данными по получению лигандов, меченных ^{64}Cu, показывает недостаточность учёта только констант устойчивости для оценки перспективности хелаторов в качестве компонентов РФП. Однако константы устойчивости показывают принципиальную возможность образования комплекса и позволяют сравнивать получаемые экспериментальные результаты с литературными данными для других молекул, полученными в тех же условиях.

В случаях комплексов меди и цинка выход реакции мечения не зависел от pH в диапазоне от 4 до 7 несмотря на то, что лиганды L1 и L2 в области низких pH в значительной степени находятся в протонированной и дипротонированной форме.

Для исследования комплексов висмута использовали рабочий раствор $[^{207}Bi]Bi^{3+}$ в HCl (Ритверц). Комплекс $[^{207}Bi]BiL2$ и ранее исследованный комплекс $[^{207}Bi]BiL3$ также образовывались в течение 10 минут после смешивания исходных растворов. Помимо протонирования лиганда влияние pH на комплексообразование может проявляться и через гидролиз катиона, что особенно актуально для трехзарядных катионов с высокой склонностью к гидролизу. На рис. 4 представлена зависимость степени мечения BiL2 от концентрации лиганда при pH 6 и 7.

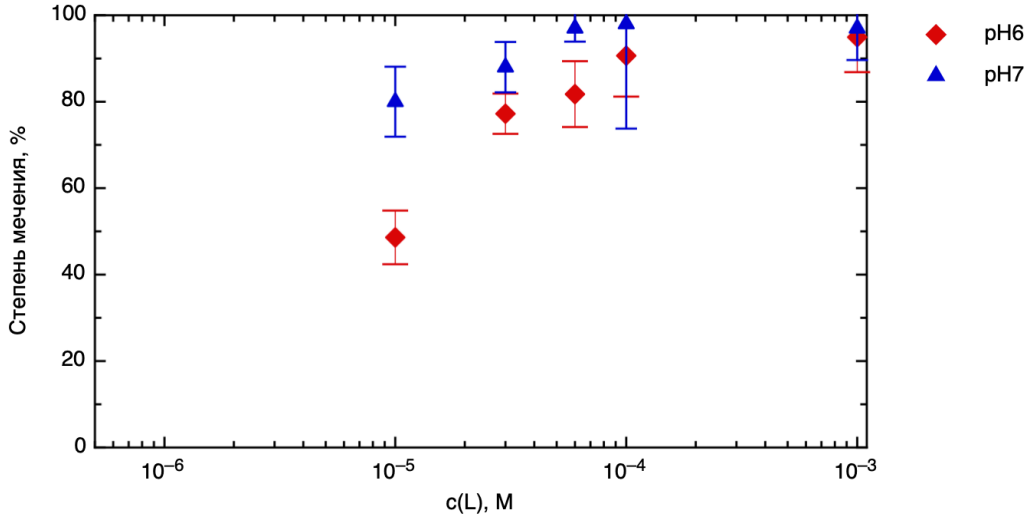

Рисунок 4. Зависимость степени мечения комплекса BiL2 от концентрации лиганда

Из полученных данных следует, что при понижении pH с 7 до 6 понижается также и степень образования комплекса несмотря на то, что для комплексов катионов, склонных к гидролизу, при повышении pH следует ожидать понижения степени связывания иона в связи с образованием гидроксокомплексов и нерастворимых гидроксидов. Этот факт связан с протонированием L2, который при pH 6 в значительной степени переходит в форму LH_2 с двумя протонированными аминогруппами. Для висмута такое протонирование электрон-донорных атомов в макроцикле оказывается критичным в связи с бóльшим радиусом катиона и, как следствие, высоким координационным числом. Таким образом установлено, что оптимальными для BiL2 являются концентрации выше $1 \cdot 10^{-4}$ M при pH 6–7.

Исследование устойчивости комплексов в условиях *in vitro*

В крови живого организма находится множество белков, способных перехелатировать вводимый радионуклид. Поэтому для первичной оценки кинетической устойчивости комплекса была изучена степень связывания радионуклидов с белками, находящимися в сыворотке крови. Для этого раствор комплекса инкубировали с эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) (V(р-ра ML):V(FBS)=1:9), после чего через определенные промежутки времени из полученной смеси отбирали аликвоты, сывороточные белки осаждали этанолом с последующим центрифугированием, после чего измеряли радиоактивность маточного раствора. С помощью данного эксперимента частично моделируется поведение комплекса непосредственно после его введения в организм и при циркуляции в кровеносной системе. На

данной стадии были изучены те комплексы, которые ранее показали высокую термодинамическую стабильность.

Устойчивость комплексов меди

Для определения устойчивости исследуемых комплексов меди к перехелатированию в сыворотке крови использовались [^{64}Cu]$CuCl_2$ (для проведения «холостых» экспериментов) и комплекс [^{64}Cu]CuDOTA в качестве образцов сравнения.

Зависимости количества радионуклидов меди, не связанных с сывороточными белками крови, от времени представлены на рис. 5. Катион Cu^{2+} из комплекса CuL1 практически сразу перехелатировался веществами, находящимися в сыворотке – зависимость связывания от времени практически аналогичная хлориду меди. При этом для комплекса CuL2, несмотря на то что его константа устойчивости больше всего на один порядок, характерна более высокая стабильность в сыворотке. Такая разница в поведении связана с особенностями координационной химии меди: для Cu^{2+} характерна квадратная или октаэдрическая геометрия комплексов, в связи с чем карбоксильные группы лиганда L2 также участвуют в хелатировании, в то время как для комплекса CuL1 не достигается координационного насыщения Cu^{2+}.

Комплексы меди с L1, L2 и L3, в отличие от комплекса CuDOTA, не проявляют устойчивости в присутствии сывороточных белков и перехелатируются ими в течение нескольких часов. Это не позволяет применять данные комплексы в качестве компонента радиофармпрепаратов с ^{64}Cu и ^{67}Cu, период полураспада которых больше, чем время, в течение которого радионуклиды будут находиться в виде комплекса (12,7 ч и 61,8 ч соответственно).

Необходимо отметить, что несмотря на диссоциацию комплекса CuL2, его можно рассматривать как компонент радиофармпрепаратов с использованием ^{62}Cu в связи с небольшим периодом полураспада последнего ($T_{1/2}$ = 9,74 мин). Для использования данного комплекса в составе *in vivo* генератора ^{62}Zn/^{62}Cu необходимы данные по устойчивости комплекса L2 с материнским радионуклидом, приведенные в следующей части данной главы.

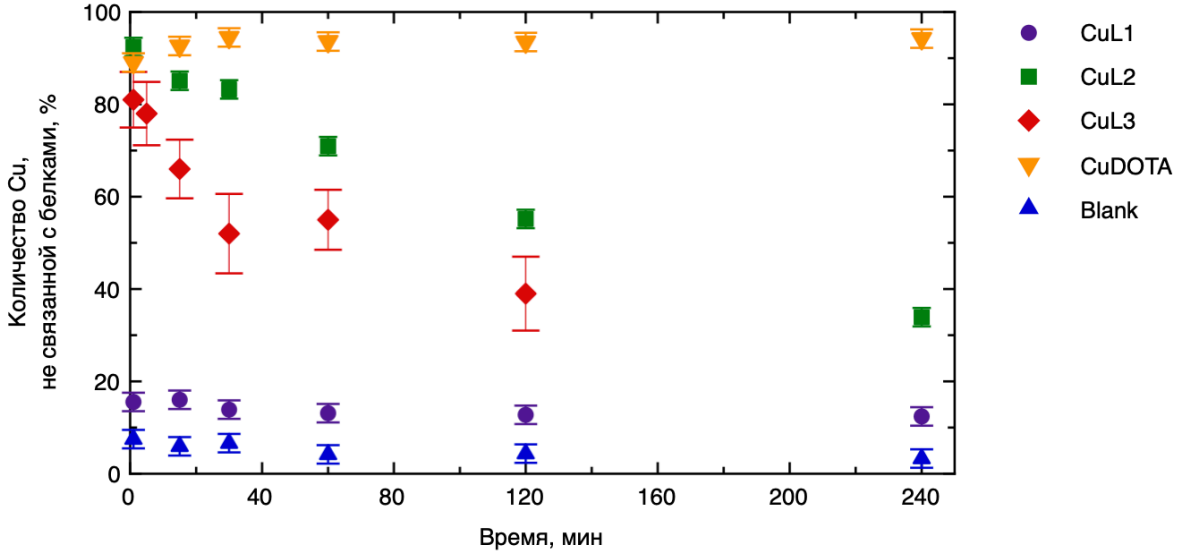

Рисунок 5. Степень связывания радионуклидов меди сывороточными белками в зависимости от времени

Устойчивость комплексов цинка

Для комплексов цинка с L2, L3 в качестве образцов сравнения использовались [^{65}Zn]$ZnCl_2$ и комплекс [^{65}Zn]ZnDOTA (рис. 6). Комплексы ZnL2 и ZnL3 проявляют высокую стабильность: радионуклид очень слабо перехелатируется сывороточными белками, в то время как в случае «холостого» эксперимента цинк практически сразу связывается сывороточными белками.

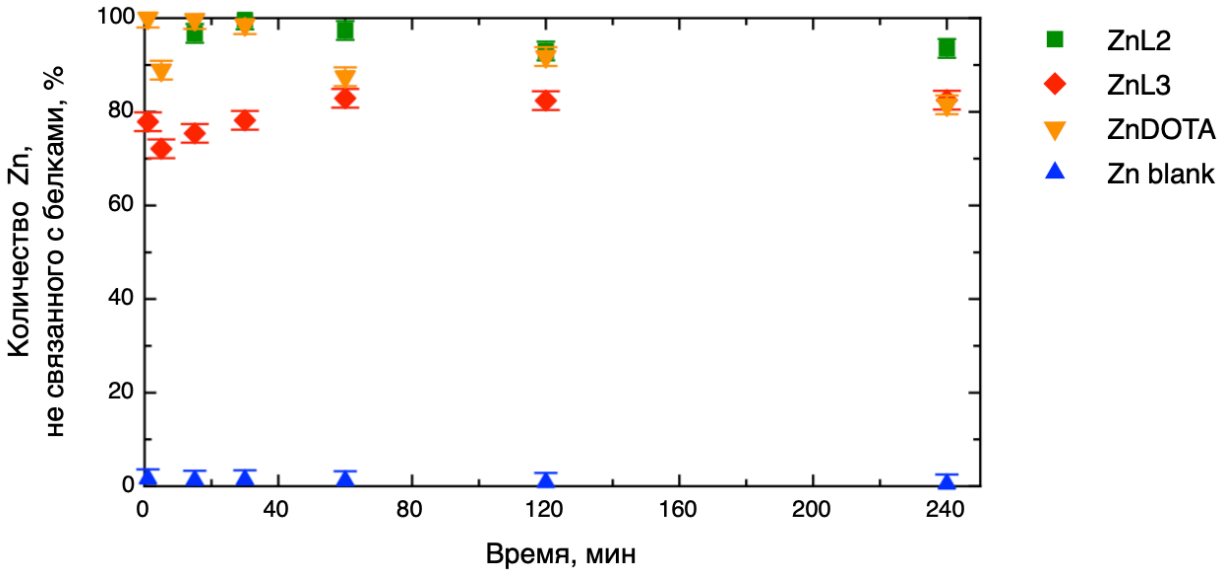

Рисунок 6. Степень связывания радионуклидов цинка сывороточными белками в зависимости от времени

Несмотря на то, что значения констант устойчивости для CuL2 и CuL3 на несколько порядков выше, чем для ZnL2 и ZnL3, комплексы цинка проявляют лучшую стабильность *in vitro*. Такая устойчивость объясняется строением комплексов цинка: тетраэдрическое окружение оказывается оптимальным для создания стерических препятствий перехелатированию катиона сывороточными белками. Оптимальными представляются оба комплекса ZnL2 и ZnL3, показавшие высокую устойчивость в сыворотке, аналогичную [^{65}Zn]ZnDOTA. Кроме того, становится возможным рассмотрение комплекса ZnL2 в качестве *in vivo* генератора ^{62}Zn/^{62}Cu.

Устойчивость комплексов висмута

Аналогичная серия экспериментов по исследованию устойчивости в сыворотке крови была проделана для комплексов висмута BiL2 и BiL3 (рис. 7). Комплексы BiL2 и BiL3 относительно быстро и в одинаковой степени диссоциируют в присутствии белков по сравнению с BiDOTA, что в данном случае определяется близкими значениями констант комплексообразования (табл. 3). Однако, необходимо принимать во внимание также период полураспада радионуклидов висмута, потенциально применимых ядерной медицине (^{213}Bi, $T_{1/2}$ = 45,59 мин; ^{212}Bi, $T_{1/2}$ = 60,55 мин). Сопоставляя эти данные, можно сделать вывод, что в течение времени пребывания радионуклида в организме бóльшая его часть будет связана с

лигандом. Следовательно, данные комплексы также представляют интерес для дальнейших исследований.

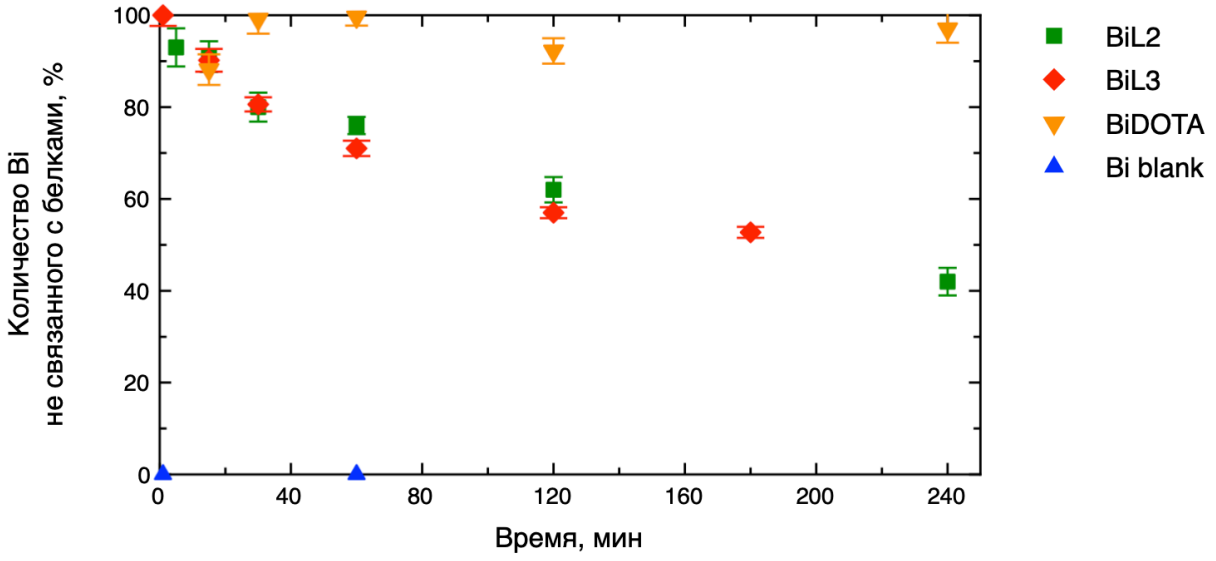

Рисунок 7. Степень связывания радионуклидов висмута сывороточными белками в зависимости от времени

Исходя из представленных выше данных, в условиях *in vivo* в дальнейшем исследовались соединения, проявившие наибольшую устойчивость и, как следствие, имеющие потенциал для применения в радиофармпрепаратах: ZnL2, ZnL3, BiL2 и BiL3.

Характеризация строения комплексов цинка и висмута

Для комплексов, представляющих наибольший интерес для анализа их распределения в условиях живого организма, необходимо знать не только константы устойчивости, но также иметь представление о строении данных соединений, так как координационное окружение катиона металла может играть решающую роль в устойчивости комплекса из-за наличия или отсутствия стерических препятствий для перехелатирования центрального атома. Характеризацию структуры проводили методами спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) и рентгеноструктурного анализа (РСА).

Из анализа спектров ЯМР для комплекса ZnL2 (рис. 8) можно заключить, что при комплексообразовании изначально эквивалентные атомы водорода становятся неэквивалентными. Из этого следует, что при образовании данного комплекса возникает асимметрия вследствие координирования карбоксильными группами и тетраэдрического окружения цинка. В то же время, комплекс продолжает оставаться симметричным относительно горизонтальной плоскости. В связи с этими данными и тем фактом, что для цинка характерно КЧ 4 можно сделать вывод, что в ZnL2 центральный атом координируется тремя азотами макроцикла и центральной карбоксильной группой.

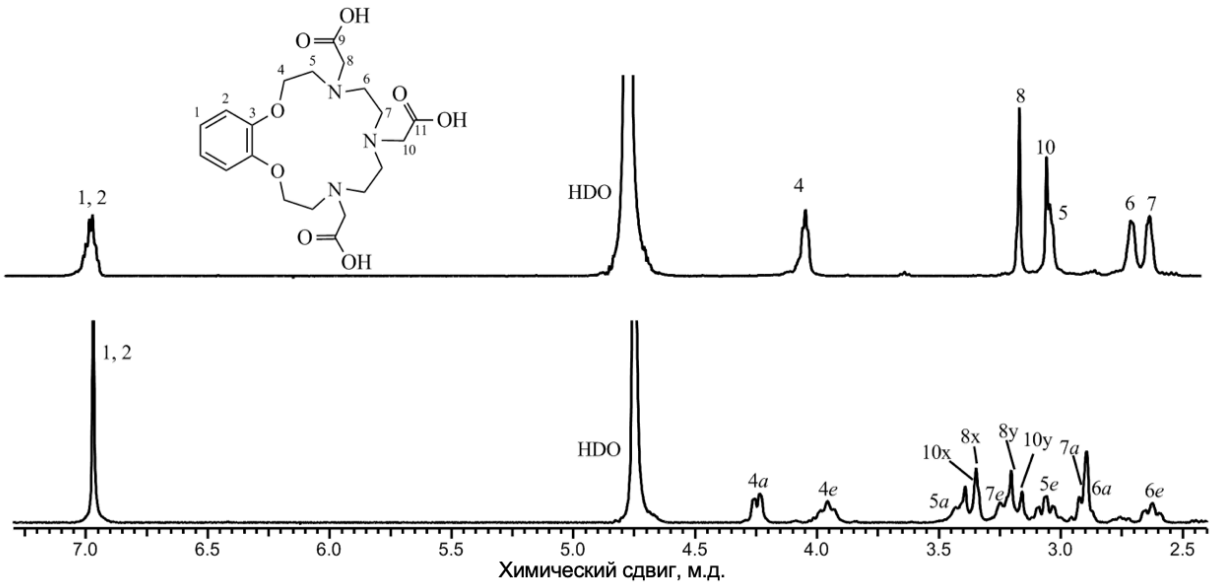

Рисунок 8. Спектры ЯМР лиганда L2 (сверху) и комплекса ZnL2 (снизу)

В то же время, сравнение ЯМР-спектров L3 и ZnL3 (рис. 9) показывает, что при образовании комплекса с цинком происходит размывание сигналов, которое определяется существованием различных вариантов координации атома металла, а также легким переходом комплекса между конформациями, время перехода между которыми меньше, чем время набора спектра.

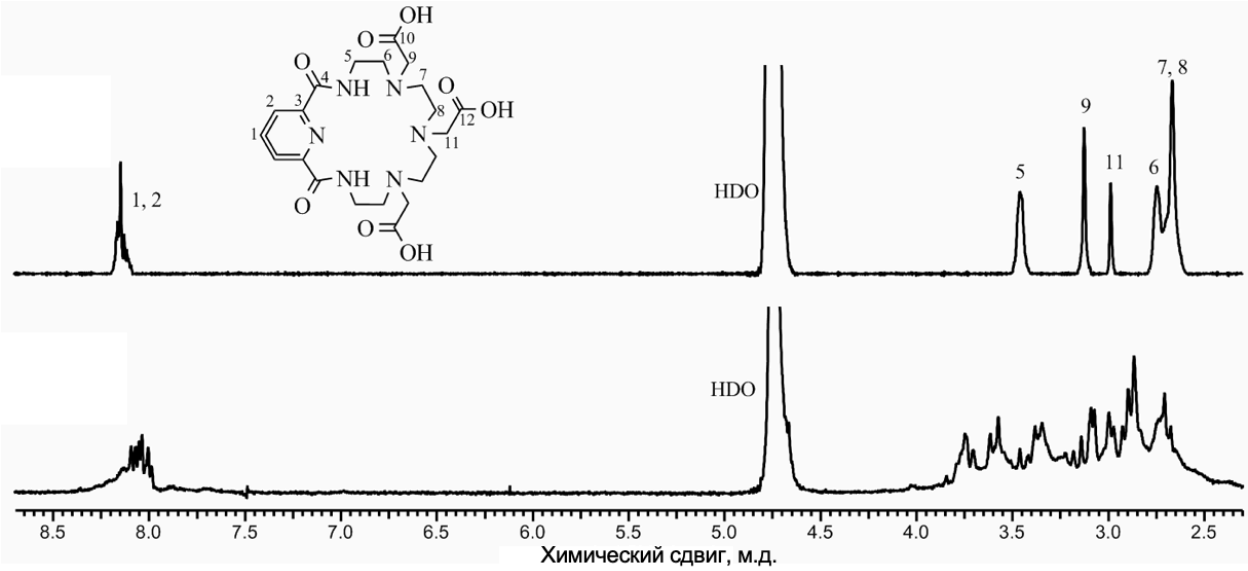

Рисунок 9. Спектры ЯМР лиганда L3 (сверху) и комплекса ZnL3 (снизу)

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, проведенного для монокристалла ZnL3, катион Zn^{2+} координируется фрагментом –NR–CH_2–CH_2–NR– молекулы L3 и двумя карбоксильными группами, при этом Zn^{2+} расположен вне полости макроцикла (рис. 10). Данные о кристаллической структуре комплекса в совокупности с данными ЯМР для водного раствора ZnL3 подтверждают, что при образовании комплекса ZnL3 не наблюдается

макроциклического эффекта, что в свою очередь сказывается на устойчивости этого комплекса *in vivo*.

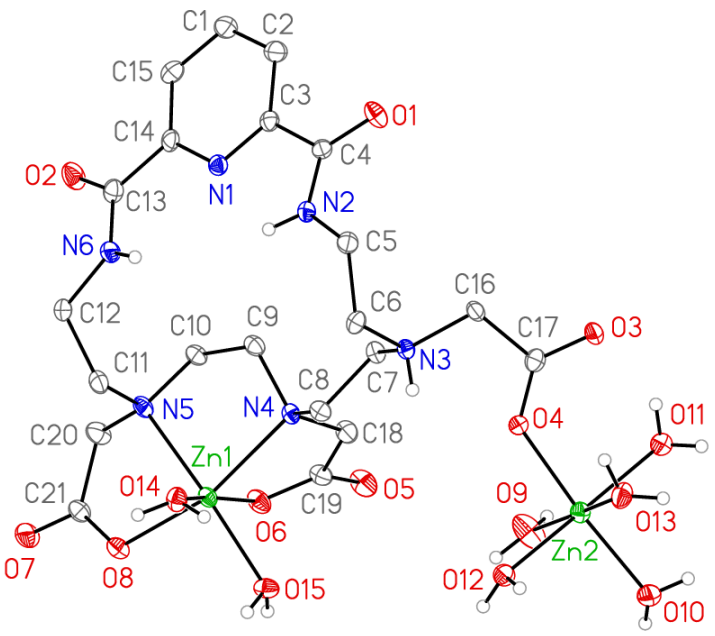

Рисунок 10. Структура катиона в кристаллической решетке ZnL3

Согласно данным ЯМР комплекс BiL2 имеет жесткую структуру, две крайние карбоксильные группы фиксированы, в то время как центральная свободно вращается, так как для нее не наблюдается расщепление сигналов протонов для CH_2-группы. При этом по данным РСА катион Bi^{3+} остается стерически доступным, что можно объяснить наличием у него асимметрической электронной пары. В то же время Bi^{3+} в комплексе BiL3 согласно ранее проведенному моделированию структуры лучше экранирован атомами лиганда. Также согласно данным ЯМР координирование катиона в BiL3 происходит всеми атомами азота в макроцикле. Такое различие в структурах BiL2 и BiL3 может быть ключевым для устойчивости комплексов в условиях живого организма.

Исследование устойчивости комплексов *in vivo*

Целью исследований поведения комплексов без вектора *in vivo* на здоровых мышах являлось изучение метаболизма исследуемых соединений и, как следствие, устойчивости комплекса в условиях живого организма. Для этого проводилось сравнение распределения комплекса по организму со свободным катионом металла или с комплексом, о котором достоверно известно, что он диссоциирует в организме. С целью соблюдения принципов гуманного обращения с лабораторными животными и минимизации количества животных, используемых в эксперименте, на данном этапе изучались только те соединения, которые ранее показали высокую устойчивость *in vitro*.

Устойчивость комплексов цинка

Полученные данные о распределении меченных комплексов цинка, приведенные в процентах от введенной дозы на грамм органа или ткани, представлены на рис. 11 и 12.

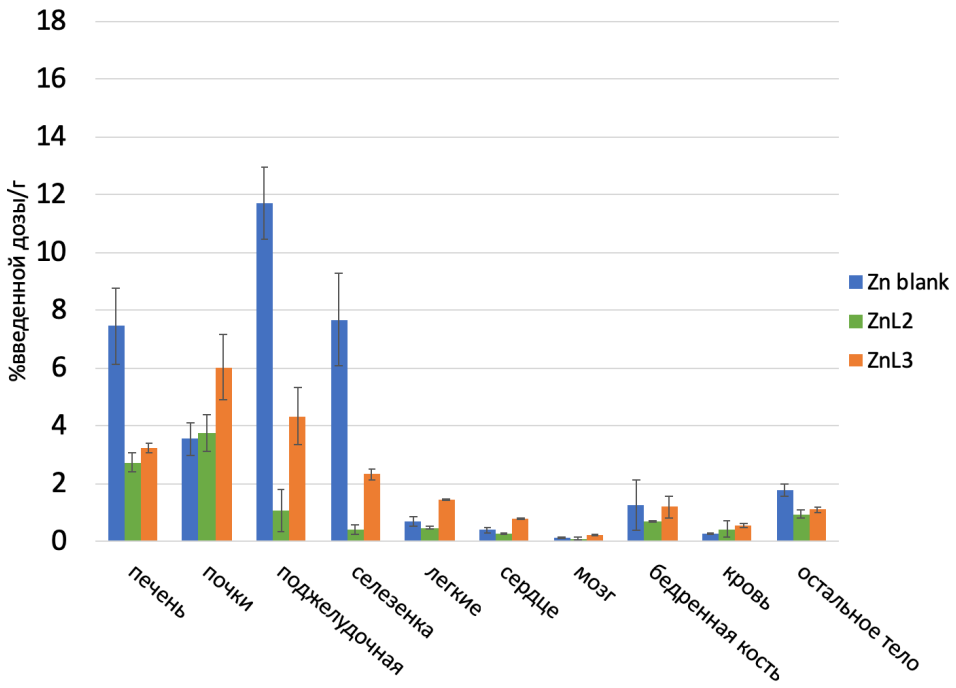

Рисунок 11. Распределение меченных соединений цинка по организму через 1 час после инъекции

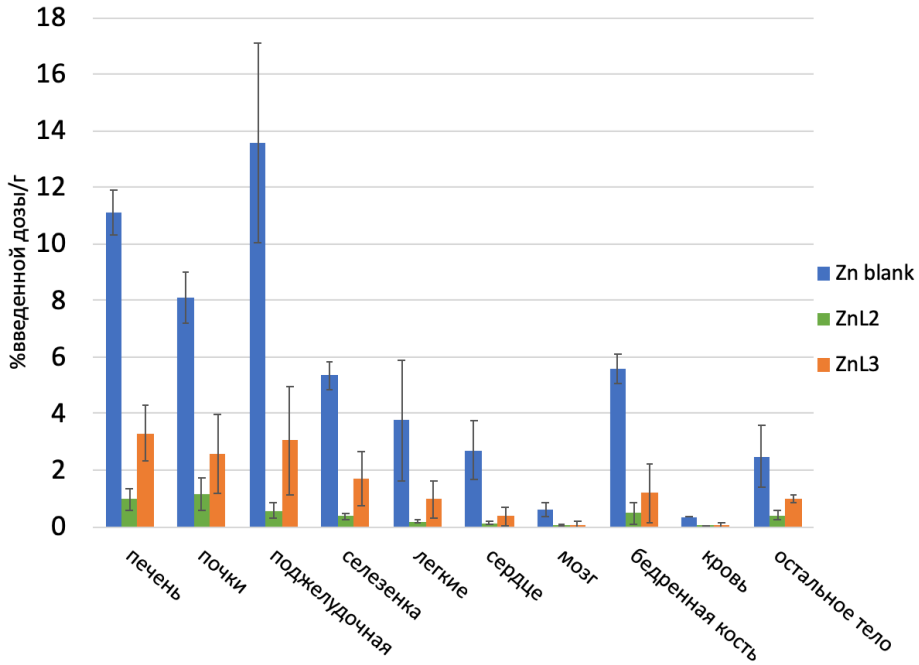

Рисунок 12. Распределение меченных комплексов цинка по организму через 6 часов после инъекции

Из представленных результатов следует, что катионы цинка, не связанные в комплекс, накапливаются преимущественно в поджелудочной железе, печени, почках, а также через 6 часов в костной ткани, что согласуется с ролью цинка в метаболизме [8]. В то же время профиль распределения комплексов ZnL2 и ZnL3 существенно отличается от «холостых» экспериментов, что определяется тем, что радиоактивная метка преимущественно остается в форме координационного соединения после инъекции препарата. Сравнивая результаты для ZnL2 и ZnL3 можно заметить, что последний проявляет большее накопление в характерных

для «холостого» эксперимента органах, что может говорить о его частичной диссоциации в организме.

Таким образом можно сделать вывод, что комплексы цинка проявляют высокую стабильность как *in vitro,* так и *in vivo*. При этом ZnL3 менее устойчив в организме, в связи с чем использование L2 для радиофармпрепаратов цинка представляется более оптимальным. Относительная стабильность ZnL2 по сравнению с ZnL3 in vivo обусловлена переходом ZnL3 между различными конформациями и отсутствием макроциклического эффекта из-за относительно большого размера цикла по сравнению с размером катиона цинка. Полученные результаты подтверждают возможность использования лиганда L2 как хелатора для ^{62}Zn с целью применения в *in vivo* генераторе ^{62}Zn/^{62}Cu.

Устойчивость комплексов висмута

При проведении экспериментов *in vivo* с комплексами висмута в качестве образца сравнения использовали комплекс [^{207}Bi]BiEDTA в связи с тем, что он характеризуется высокой скоростью диссоциации в условиях *in vivo*. Непосредственное использование растворов [^{207}Bi]Bi^{3+} невозможно в связи с гидролизом последнего с образованием нерастворимого гидроксида и гидроксокомплексов и, как следствие, недостоверностью получаемых данных [9]. Результаты измерений представлены на рис. 13 и 14.

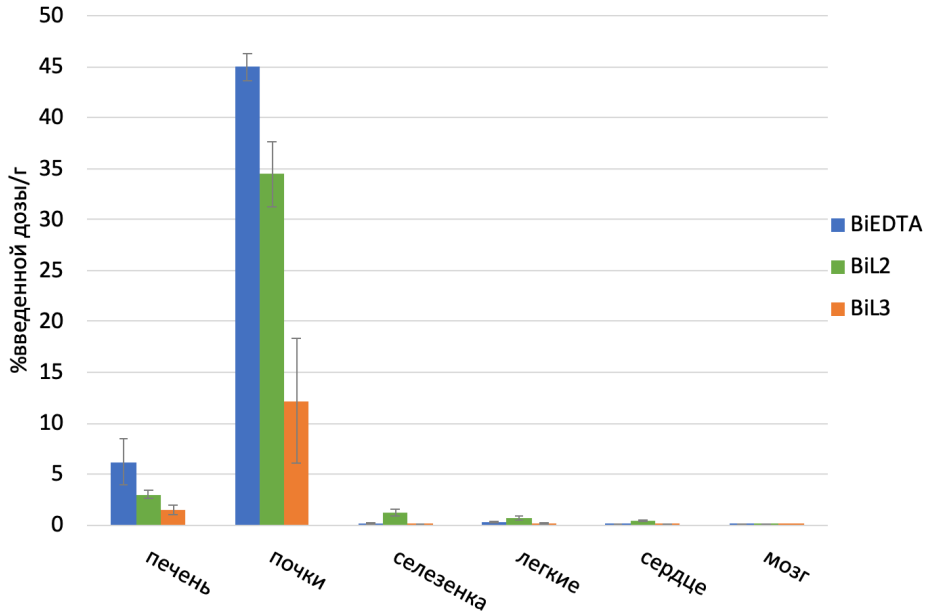

Рисунок 13. Распределение меченных комплексов висмута по организму через 1 час после инъекции

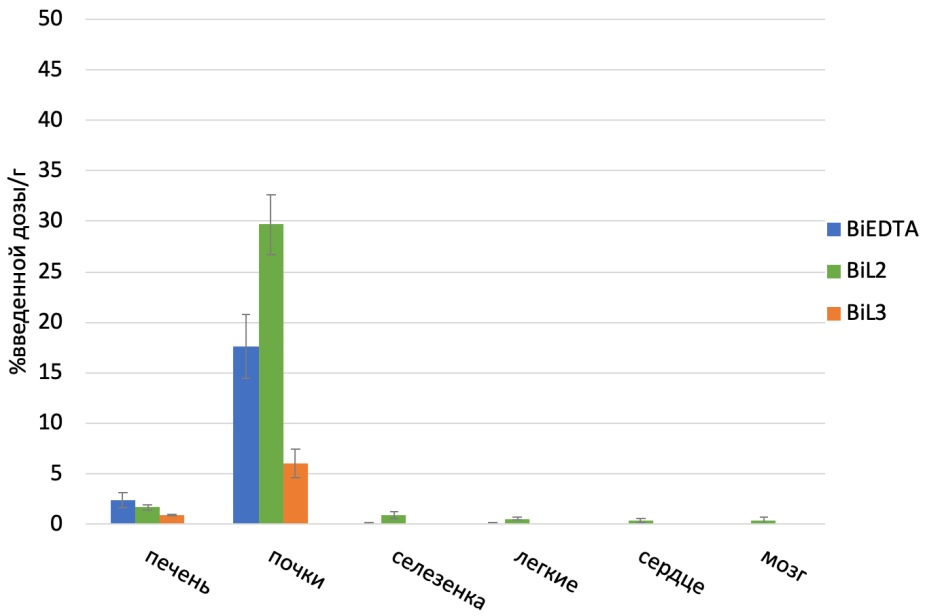

Рисунок 14. Распределение меченных комплексов висмута по организму через 6 часов после инъекции

Полученные данные показывают, что комплекс [^{207}Bi]BiEDTA, как и ожидалось, быстро диссоциирует в организме, и радионуклид накапливается преимущественно в почках. Количество накопленного радионуклида при этом крайне слабо меняется в течение 6 часов.

Для комплексов BiL2 и BiL3 было проведено сравнение устойчивости в организме. Оба комплекса имеют практически идентичные значения констант устойчивости и схожее поведение в условиях *in vitro*, однако поведение *in vivo* кардинально различается: BiL2 проявляет медленную экскрецию и накапливается в почках из-за диссоциации комплекса, в то время как BiL3 относительно быстро выводится из организма. Это можно объяснить большей стерической доступностью атома висмута в BiL2, в то время как в случае BiL3 за счёт большего размера макроцикла достигается более полное экранирование катиона со всех сторон. Данный пространственный фактор, по-видимому, сильно влияет на устойчивость комплекса в ходе метаболизма и играет критическую роль при перехелатировании катиона висмута в условиях живого организма. Таким образом, из изученных комплексов висмута только BiL3 возможно рассматривать как потенциальный компонент радиофармпрепаратов.

ВЫВОДЫ

- Разработаны методики выделения ^{67}Cu, ^{65}Zn и ^{69m}Zn из продуктов облучения металлических мишеней с использованием ионообменной хроматографии, позволяющие с выходом ≥92% получить продукт с радионуклидной чистотой более 99%.
- Определены значения констант устойчивости комплексов Cu^{2+}, Zn^{2+} и Bi^{3+} с новыми азакраун-эфирами. Установлено, что наличие карбоксильных групп сильнее сказывается на величине констант устойчивости для комплексов цинка по сравнению с медью, что можно связать с большей жесткостью цинка как кислоты Льюиса и основностью третичных аминогрупп по сравнению со вторичными. Аналогичная ситуация имеет место

в случае катионов висмута, для которого образование устойчивого соединения с L1 не наблюдалось.

- Для комплексов CuL1, CuL2, CuL3, ZnL2, ZnL3 и BiL2 определены условия образования меченых соединений. Достаточная степень связывания радионуклида в комплекс (более 90%) наблюдается при концентрациях лигандов $1\cdot10^{-4} \div 1\cdot10^{-3}$ М. Для BiL2 выход реакции мечения понижается при уменьшении pH в отличие от аналогичных комплексов Cu^{2+} и Zn^{2+} в связи с бóльшим координационным числом Bi^{3+} и изменением дентатности лиганда при протонировании.
- Комплексы меди с L1, L2 и L3 не проявляют устойчивости к перехелатированию белками сыворотки крови, несмотря на высокие значения констант комплексообразования, в то время как комплексы ZnL2 и ZnL3 устойчивы *in vitro*. Комплексы BiL2 и BiL3 проявляют умеренную стабильность в сыворотке крови, приемлемую для радиофармпрепаратов, содержащих короткоживущие ^{212}Bi и ^{213}Bi.
- Относительная стабильность ZnL2 по сравнению с ZnL3 *in vivo* обусловлена переходом ZnL3 между различными конформациями и отсутствием макроциклического эффекта из-за относительно большого размера цикла.
- Учитывая термодинамическую устойчивость комплексов ZnL2 и CuL2, а также стабильность ZnL2 *in vitro* и *in vivo* лиганд L2 представляет интерес для получения радиофармпрепаратов на основе *in vivo* генератора ^{62}Zn/^{62}Cu.
- Комплекс BiL3 устойчив *in vivo*, не проявляя накопления в органах лабораторной мыши, в отличие от BiL2, что коррелирует с большей стерической доступностью центрального атома в макроцикле меньшего размера L2.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus.

1. G.Yu. Aleshin, B.V. Egorova, A.B. Priselkova, L.S. Zamurueva, S.Yu. Khabirova, A.D. Zubenko, V.A. Karnoukhova, O.A. Fedorova, S.N. Kalmykov. Zinc and copper complexes with azacrown ethers and their comparative stability *in vitro* and *in vivo* // Dalton Transactions, 2020, Vol. 49, № 19. P. 6249–6258 (Импакт-фактор: 4,052)
2. E.V. Matazova, B.V. Egorova, E.A. Konopkina, G.Yu. Aleshin, A.D. Zubenko, A.A. Mitrofanov, Karpov K. V., Fedorova O.A., Fedorov Y. V., Kalmykov S.N. Benzoazacrown compound: a highly effective chelator for therapeutic bismuth radioisotopes // MedChemComm, 2019. Vol. 10, № 9. P. 1641–1645. (Импакт-фактор: 2,342)
3. R.A. Aliev, S.S. Belyshev, A.A. Kuznetsov, L.Z. Dzhilavyan, V.V. Khankin, G.Yu. Aleshin, A.G. Kazakov, A.B. Priselkova, S.N. Kalmykov, B.S. Ishkhanov. Photonuclear production and radiochemical separation of medically relevant radionuclides: ^{67}Cu // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2019. Vol. 321, № 1. P. 125–132. (Импакт-фактор: 1,181)
4. B.V. Egorova, E.V. Matazova, A.A. Mitrofanov, G.Yu. Aleshin, A.L. Trigub, A.D. Zubenko, O.A. Fedorova, Yu.V. Fedorov, S.N. Kalmykov. Novel pyridine-containing azacrown-ethers for the chelation of therapeutic bismuth radioisotopes: Complexation study, radiolabeling,

serum stability and biodistribution // Nuclear Medicine and Biology, 2018. Vol. 60. P. 1–10. (Импакт-фактор: 2,203)

5. 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. Фотоядерное получение радионуклидов без носителя: Zn-69m // Известия Академии наук. Серия химическая. 2017. № 2. С. 373–375. (Импакт-фактор: 0,972)

Публикации в сборниках материалов и тезисов конференций:

1. G.Yu. Aleshin, B.V. Egorova, S.Yu. Khabirova, A.D. Zubenko, O.A. Fedorova, A.B. Priselkova, S.N. Kalmykov. Zinc complex with azacrown-derivative and its in vitro stability // тезисы конференции «International Symposium on Metal Complexes (ISMEC) 2019». Дебрецен, Венгрия, 2019. P. 87.
2. B.V. Egorova, E.V. Matazova, G.Yu. Aleshin, A.D. Zubenko, S.N. Kalmykov, Yu.V. Fedorov, A.V. Medved'ko, S.Z. Vatsadze, A.B. Priselkova, O.A. Fedorova. Ligands for chelation of Bismuth and Copper: complexation study and stability in biologically relevant media // тезисы конференции «International Symposium on Metal Complexes (ISMEC) 2019». Дебрецен, Венгрия, 2019. P. 74
3. B.V. Egorova, E.V. Matazova, G.Yu. Aleshin, A.D. Zubenko, S.N. Kalmykov, A.V. Medved'ko, S.Z. Vatsadze, O.A. Fedorova, Yu.V. Fedorov, A.N. Moiseeva. Complexation of medical radionuclides by azacrown-ethers and bispidines. // Тезисы конференции «The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research». Москва, Россия, 2018. P. 20
4. Г.Ю. Алешин, Б.В. Егорова, Л.С. Замуруева. Определение устойчивости комплексов меди и цинка с азакраун-эфирами и их конъюгатов с тетрапептидом. // тезисы конференции «IX Российская конференция с международным участием «РАДИОХИМИЯ-2018». Санкт-Петербург, Россия, 2018. С. 471.
5. Б.В. Егорова, Е.В. Матазова, Г.Ю. Алешин, С.Н. Калмыков, О.А. Федорова, Ю.В. Федоров, А.Д. Зубенко. Новые бензоазакраун-эфиры для связывания катионов радионуклидов Y-90, Bi-213 и Ac-225. // тезисы конференции «IX Российская конференция с международным участием «РАДИОХИМИЯ-2018». Санкт-Петербург, Россия, 2018. С. 491.
6. B.V. Egorova, E.V. Matazova, A.A. Mitrofanov, G.Yu. Aleshin, S.N. Kalmykov, A.D. Zubenko, O.A. Fedorova, Yu.V. Fedorov, A.L. Trigub. Novel pyridine-containing azacrown-ethers for the chelation of therapeutic bismuth radioisotopes: complexation study, radiolabeling, serum stability and biodistribution. // тезисы конференции «13th International Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopes and Isotonically Labelled Compounds». Прага, Чехия, 2018. P. 93

Список литературы

1. Fedorov Y. V, Fedorova O.A., Kalmykov S.N., Oshchepkov M.S., Nelubina Y. V, Arkhipov D.E., Egorova B. V, Zubenko A.D. Potentiometric studies of complex formation of amidopyridine macrocycles bearing pendant arms with proton and heavy metal ions in aqueous solution // Polyhedron. 2017. Vol. 124. P. 229–236.

2. Kragten J., Decnop-Weever L.G., Gründler P. Mixed hydroxide complex formation and solubility of bismuth in nitrate and perchlorate medium // Talanta. 1993. Vol. 40, № 4. P. 485–490.
3. Egorova B. V., Matazova E. V., Mitrofanov A.A., Aleshin G.Y., Trigub A.L., Zubenko A.D., Fedorova O.A., Fedorov Y. V., Kalmykov S.N. Novel pyridine-containing azacrown-ethers for the chelation of therapeutic bismuth radioisotopes: Complexation study, radiolabeling, serum stability and biodistribution // Nuclear Medicine and Biology. 2018. Vol. 60. P. 1–10.
4. Martell A.E., Smith R.M. Critical Stability Constants. Volume 6. Second Supplement. New York: Springer Science + Business Media, 1989.
5. Holloway J.H., Reilley C.N. Metal Chelate Stability Constants of Aminopolycar-boxylate Ligands // Analytical Chemistry. 1960. Vol. 32, № 2. P. 249–256.
6. Shannon R.D. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides // Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography. 1976. Vol. A 32. P. 751–767.
7. Dirks C., Scholten B., Happel S., Zulauf A., Bombard A., Jungclas H. Characterisation of a Cu selective resin and its application to the production of ^{64}Cu // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2010. Vol. 286, № 3. P. 671–674.
8. Williams R.J.P. The Biochemistry of Zinc // Polyhedron. 1987. Vol. 6, № 1. P. 61–69.
9. Ruegg C.L., Anderson-Berg W.T., Brechbiel M.W., Mirzadeh S., Gansow O.A., Strand M. Improved in Vivo Stability and Tumor Targeting of Bismuth-labeled Antibody // Cancer Research. 1990. Vol. 50, № 14. P. 4221–4226.

Благодарности

Автор искренне признателен своим научным руководителям к.х.н. Б.В. Егоровой и д.х.н. С.Н. Калмыкову за помощь, ценные советы, замечания и обсуждения в ходе подготовки диссертации.

Автор выражает благодарность д.х.н. О.А. Федоровой и к.х.н. А.Д. Зубенко (ИНЭОС РАН) за синтез лигандов, съемку и обработку ЯМР-спектров, В.А. Карноуховой (ИНЭОС РАН) за проведение рентгеноструктурного анализа образцов, А.Б. Приселковой и д.ф.-м.н Д.О. Еременко (НИИЯФ МГУ) за проведение облучений мишеней, к.х.н. Р.А Алиеву, д.х.н. М.А. Орловой, Л.С. Замуруевой и С.Ю. Хабировой за помощь в проведении отдельных экспериментов.

Особую благодарность автор выражает своей семье, друзьям и близким за поддержку и оптимизм.