

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Алешин Глеб Юрьевич

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

02.00.14 – радиохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н., член-корр. РАН Калмыков С.Н.

к.х.н. Егорова Б.В.

Москва – 2020

Содержание

Список условных обозначений и сокращений.....	5
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1 Методы диагностики и терапии с использованием радионуклидов.....	11
1.1.1 Диагностические методы.....	11
Однофотонная эмиссионная компьютерная томография	11
Позитронно-эмиссионная томография	14
1.1.2 Терапевтические методы.....	18
1.2 Лиганды, применимые в радиофармпрепаратах	21
1.2.1 Макроциклические лиганды	23
1.2.2 Ациклические лиганды	30
1.3 Соединения исследуемых металлов в ядерной медицине	33
1.3.1 Соединения меди в ядерной медицине	35
Медицинские радионуклиды меди	35
Биологическая роль меди	36
Радиофармпрепараты с радионуклидами меди.....	37
1.3.2 Соединения цинка в ядерной медицине	41
Медицинские радионуклиды цинка	41
Биологическая роль цинка	42
Радиофармпрепараты с радионуклидами цинка.....	43
1.3.3 Соединения висмута в ядерной медицине	44
Медицинские радионуклиды висмута.....	44
Радиофармпрепараты с радионуклидами висмута	46
1.4 Заключение из обзора литературы	49
Глава 2. Экспериментальная часть	52
2.1 Используемые реактивы	52
2.2 Инструментальные и расчетные методы	53
2.2.1 Гамма-спектрометрия	53
2.2.2 Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия	53
2.2.3 Спектроскопия в УФ-видимом диапазоне спектра.....	53
2.2.4 Авторадиография	53
2.2.5 Спектроскопия ядерно-магнитного резонанса	53

2.2.6	Рентгеноструктурный анализ	54
2.3	Получение и выделение радионуклидов	54
2.3.1	Наработка радионуклидов меди и цинка	54
2.3.2	Выделение радионуклидов меди	55
2.3.3	Выделение радионуклидов цинка	55
2.4	Изучение термодинамической устойчивости комплексов	56
2.4.1	Потенциометрическое титрование	56
2.4.2	Расчет константы протонирования лиганда и констант устойчивости комплексов	57
2.4.3	Жидкость-жидкостная экстракция катионов Bi^{3+}	57
2.4.4	Осаждение нерастворимых соединений Bi^{3+}	58
2.5	Определение степени связывания радионуклидов от концентрации лигандов .	58
2.6	Изучение устойчивости комплексов в сыворотке крови	59
2.7	Проведение экспериментов <i>in vivo</i>	59
Глава 3. Выделение радионуклидов меди и цинка из облученных металлических мишеней		61
3.1	Хроматографическое выделение ^{67}Cu и ^{64}Cu.....	61
3.1.1	Выделение ^{67}Cu	61
3.1.2	Выделение ^{64}Cu	63
3.2	Хроматографическое выделение $^{69\text{m}}\text{Zn}$ и ^{65}Zn	64
3.2.1	Выделение $^{69\text{m}}\text{Zn}$	64
3.2.2	Выделение ^{65}Zn	67
Глава 4. Определение констант устойчивости комплексов		69
4.1	Определение констант протонирования лигандов	69
4.2	Определение констант устойчивости комплексов.....	73
Глава 5. Определение условий образования меченных комплексов		82
5.1	Подбор условий проведения тонкослойной хроматографии	82
5.2	Определение условий получения комплексов.....	85
Глава 6. Исследование устойчивости комплексов в условиях <i>in vitro</i> ...		90
6.1	Устойчивость комплексов меди	90
6.2	Устойчивость комплексов цинка	92

6.3	Устойчивость комплексов висмута.....	93
Глава 7. Характеризация строения комплексов цинка и висмута		94
7.1	Строение комплексов ZnL_2 и ZnL_3	94
7.2	Строение комплексов BiL_2 и BiL_3	97
Глава 8. Исследование устойчивости комплексов <i>in vivo</i>		100
8.1	Устойчивость комплексов цинка	101
8.2	Устойчивость комплексов висмута.....	104
Выводы		106
Список литературы		108
Благодарности		128
Приложения		129

Список условных обозначений и сокращений

[¹⁸F]ФДГ – 2-фтор-2-дезоксид-D-глюкозы

ИП – изомерный переход

ЖМКО – принцип жестких и мягких кислот и оснований

КЧ – координационное число

МИБК – метилизобутилкетон

МРТ – магнитно-резонансная томография

ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

ПЭТ-КТ – позитронно-эмиссионная томография, комбинированная с компьютерной томографией

ТСХ – тонкослойная томография

ЭЗ – электронный захват

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

ATSM – диацетил-бис(N⁴-метилтиосемикарбазон)

DOTA – 1,4,7,10-тетраазадодекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота

DTPA – диэтиленetriаминтетрауксусная кислота

EDDA – Этилендиамин-N,N-диуксусная кислота

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

L1, L2, L3 – лиганды, исследуемые в данной работе (рис. 1)

NOTA – 1,4,7-триазаиклононан-1,4,7-триуксусной кислотой

PSMA – простатический специфический мембранный антиген

TETA – 1,4,8,11-тетраазаиклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота

Введение

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 одним 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 , $^{69\text{m}}\text{Zn}$), 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 , $^{69\text{m}}\text{Zn}$ 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*.

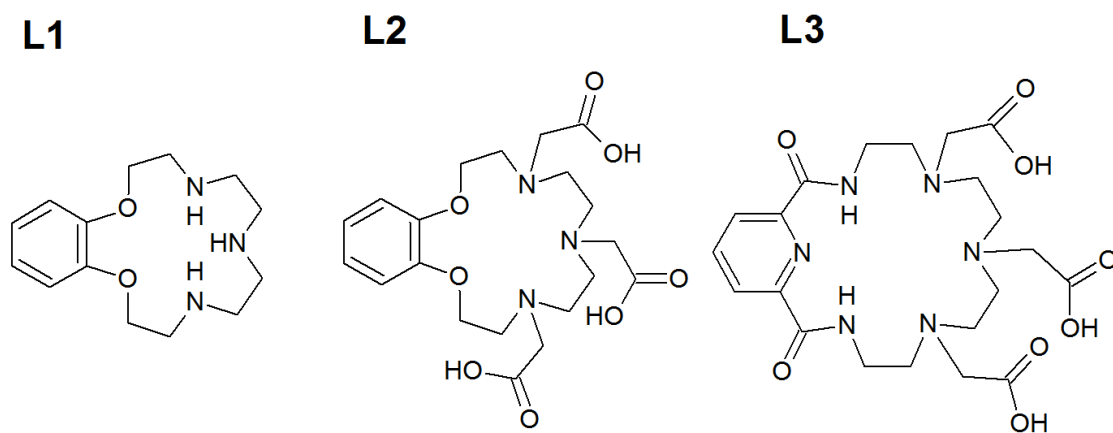


Рисунок 1. Лиганды L1, L2 и L3

Научная новизна

- Разработаны методики выделения ^{67}Cu , ^{65}Zn и $^{69\text{m}}\text{Zn}$ 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 в дальнейшем 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, автордиография, 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 $^{69\text{m}}\text{Zn}$ 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 ZnL_2 , ZnL_3 , BiL_2 и BiL_3 в организме лабораторной мыши, устойчивость комплексов ZnL_2 и BiL_3 *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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Методы диагностики и терапии с использованием радионуклидов

Как диагностические, так и терапевтические методы ядерной медицины включают в себя введение и направленную доставку соединения, содержащего радионуклид. В зависимости от типа и энергии излучения различные радионуклиды могут использоваться как для терапии (испускание α и β^- -частиц, электронов внутренней конверсии, Оже-электронов), так и для диагностики (испускание β^+ -частиц или γ -квантов) [1]. Соответственно, ядерно-физические свойства, включая период полураспада, главным образом определяют возможность использования радионуклида в ядерной медицине.

В данной части рассмотрены основные физические принципы методов ядерной медицины, а также требования к используемому источнику ионизирующего излучения.

1.1.1 Диагностические методы

Диагностические методы ядерной медицины используют радионуклиды, излучающие в ходе распада гамма-кванты в связи с их высокой проникающей способностью. Существует два основных томографических метода регистрации гамма-излучения, исходящего от введенного в организм радиофармпрепарата: однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и позитронная эмиссионная томография (ПЭТ). Сканирование ПЭТ и ОФЭКТ может предоставить подробную информацию о том, в каких областях организма находятся новообразования или как осуществляются отдельные функции организма, а также, после постановки диагноза и начала терапии, могут показать, насколько эффективно назначенное лечение. Кроме того, в ряде случаев распределение метки в организме регистрируют с помощью сцинтиграфии, получая двухмерные изображения.

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография

В основе метода однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) лежит детектирование гамма-излучения, исходящего от введенного

радионуклида, с помощью гамма-камеры, предложенной Г. Ангером [2]. Гамма-излучение регистрируется с помощью плоского сцинтиллирующего монокристалла больших размеров и расположенными над ним фотоумножителями, и таким образом получается плоское изображение, показывающее распределение радионуклида в данной проекции [1]. При вращении детектора вокруг пациента регистрируется серия таких проекций под различными углами, что в дальнейшем при компьютерной обработке позволяет смоделировать распределение метки в трехмерном виде. Данный подход также может показать распределение радионуклида в поперечном сечении. Метод ОФЭКТ используется для радионуклидов, испускающих одиночный или несколько гамма-лучей без угловой корреляции [3].

В процессе выбора радионуклида для ОФЭКТ необходимо учитывать его тип распада, а также энергию гамма-излучения: при слишком низких энергиях будет невозможно зарегистрировать сигнал из-за поглощения излучения тканями, а при слишком высоких снижается эффективность его регистрации детектором. Оптимальные для ОФЭКТ радионуклиды должны обладать преимущественно монохроматическим излучением с энергией гамма-квантов в диапазоне 100–200 кэВ. Кроме того, при распаде данных изотопов должна быть высокая вероятность испускания гамма-кванта подходящей энергии, а также сопоставимый с временем исследования период полураспада и, по возможности, наиболее простой и экономичный способ получения [1].

Основным радионуклидом для ОФЭКТ, применяемым на данный момент, является $^{99\text{m}}\text{Tc}$: с его использованием проводится более 80% диагностических процедур ОФЭКТ [1]. Такое распространение технеция в ядерной медицине обусловлено подходящими ядерно-физическими характеристиками ($T_{1/2} = 6,06$ ч, $E_\gamma = 140$ кэВ), удобным способом получения из радионуклидного генератора $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Кроме того, технеций может проявлять степени окисления от +1 до +7, что позволяет создавать огромное разнообразие радиофармпрепаратов на его основе. Также соединения технеция являются ксенобиотиками, то есть веществами, чужеродными организму и, как следствие, функциональные свойства таких меченных соединений можно задавать с помощью хелаторов и связанных с ними биологических векторов [1].

Радионуклиды, применяемые в ОФЭКТ, как правило, распадаются путем изомерного перехода (ИП) или электронного захвата (ЭЗ) (табл. 1). При этом в

большинстве случаев для проведения необходимого исследования радионуклиды связываются в комплекс с лигандом. Одним из исключений из этого являются радиофармпрепараты на основе изотопов иода, который может связываться ковалентными связями с различными молекулами с помощью радиоiodирования [4]. Кроме того, некоторые радионуклиды из-за специфической биологической роли соответствующих элементов могут использоваться в свободном виде. Так, $^{201}\text{Tl}^+$ используется в исследованиях перфузии миокарда, а $^{123}\text{I}^-$ – в исследованиях щитовидной железы. Некоторые радионуклиды, имеющие относительно высокие энергии гамма-излучения, могут использоваться в нетомографических методах исследования: ^{131}I , ^{59}Fe и ^{51}Cr могут применять в гематологии для исследования обменных процессов методом радиометрии [1].

Таблица 1. Основные радионуклиды, применяемые в ОФЭКТ [5].

Радионуклид	$T_{1/2}$	Метод получения	Тип распада	Продукт распада	$E_\gamma (p_{max})$, кэВ
^{67}Ga	3,3 д	$^{67}\text{Zn}(p,n)^{67}\text{Ga}$ $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$	ЭЗ (100%)	^{67}Zn	93
^{67}Cu	2,6 д	$^{68}\text{Zn}(\gamma,p)^{67}\text{Cu}$	β^- (100%) γ (52%)	^{67}Zn	185
^{99m}Tc	6,0 ч	Генератор $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	ИП (89%)	^{99}Tc	140
^{111}In	2,8 д	$^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$ $^{112}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$	ЭЗ (100%)	^{111}Cd	245
^{123}I	13,3 ч	Генератор $^{123}\text{Xe}/^{123}\text{I}$ $^{124}\text{Xe}(p,pn)^{123}\text{I}$	ЭЗ (100%)	^{123}Te	159
^{153}Sm	46,3 ч	$^{152}\text{Sm}(n,\gamma)^{153}\text{Sm}$	β^- (100%) γ (29%)	^{153}Eu	103
^{159}Gd	18,5 ч	Бомбардировка Gd_2O_3 тепловыми нейтронами	γ (11,4%)	^{159}Tb	363

Позитронно-эмиссионная томография

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) – метод количественной характеристики биохимических и физиологических процессов в живом организме, использующий позитрон-излучающие радионуклиды. Данный метод основан на детектировании гамма-излучения, испускаемого при аннигиляции позитрона и электрона, в результате которой испускается два гамма-кванта с энергией 511 кэВ, распространяющиеся под углом 180° . Такая угловая корреляция позволяет использовать детекторы без поглощающих коллиматоров, что увеличивает эффективность регистрации и позволяет локализовать источник излучения вдоль линии между двумя детекторами, расположенными напротив друг друга; этот фактор является основным преимуществом данного метода томографии перед ОФЭКТ [6].

В ПЭТ необходима не только регистрация гамма-кванта, пришедшего в детектор, но и совпадение этих событий в противоположных детекторах, что осуществляется с помощью компьютерной обработки данных. В таком случае при получении томограммы ПЭТ при регистрации сигнала также записывается цифровая метка времени к записи для каждого обнаруженного события (как правило, это делается с точностью приблизительно 1 или 2 наносекунды). Процессор совпадений проверяет отметку времени для каждого события по сравнению с событиями, записанными в противоположащих детекторах. Предполагается, что событие совпадения произошло, когда пара событий регистрируется в определенном окне синхронизации совпадений, которое обычно составляет от 6 до 12 наносекунд [3]. Схема событий, ведущих к регистрации сигнала в ПЭТ, представлена на рис. 2.

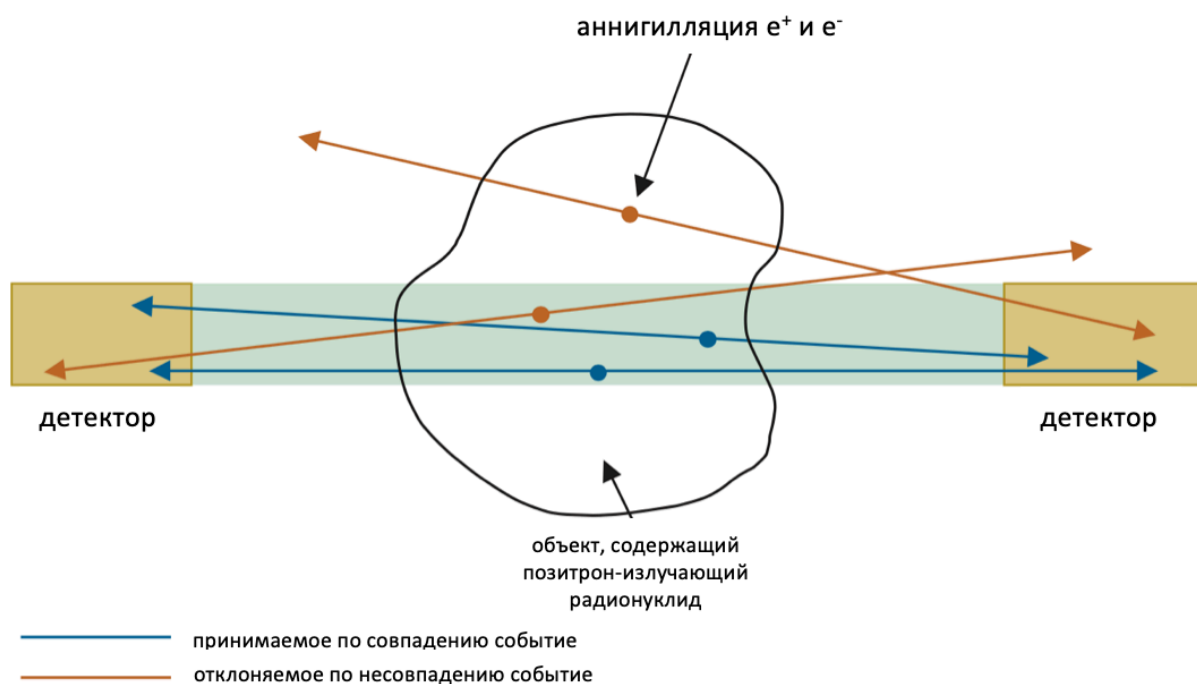


Рисунок 2. Схематичное изображение событий в ПЭТ, ведущих и не ведущих к регистрации сигнала [3].

Хотя аннигиляционные фотоны излучаются одновременно, требуется время, чтобы обеспечить разницу во времени прохождения сигнала в детекторе, а также различные расстояния перемещения двух фотонов от события аннигиляции до детекторов. Кроме того, детекторы в ПЭТ-сканере не имеют идеальной временной синхронизации и поэтому имеют конечное временное разрешение. Неопределенности, влияющие на временное разрешение, могут возникать из-за статистического характера сигнала (который получается путем преобразования фотонов 511 кэВ в электронно-дырочные пары или видимое излучение в детекторах различного типа), а также из электронных шумов в детекторе и связанных с ним электросхемах. Для сцинтилляционных детекторов неопределенность времени уменьшается, а разрешение по времени улучшается с использованием более ярких и быстрых сцинтилляторов, которые генерируют большое количество световых фотонов за короткий промежуток времени сразу после взаимодействия. Разрешение синхронизации обычно находится в диапазоне от 0,5 до 5 нс, в зависимости от того, какой сцинтиллятор и фотоприемник используются [3].

В табл. 2 приведены основные радионуклиды, применяемые в ПЭТ. Помимо типа распада, к изотопам, применимым в ПЭТ, предъявляются требования по периоду полураспада (сопоставим с временем проведения исследования), доступность метода получения. Кроме того, для получения хорошего разрешения

необходим минимальный пробег позитрона от места распада ядра, а это накладывает ограничения на энергию частицы, получающейся при радиоактивном распаде. Как видно из табл. 2, большинство изотопов имеют весьма значительный пробег позитрона от места распада ядра, что приводит к существенному снижению разрешающей способности томографии (2–7 мм против 1 мм у ОФЭКТ или МРТ) [1]. В связи с чем крайне важным для дальнейшего развития ПЭТ стало создание гибридной установки ПЭТ-КТ [7]. Несмотря на то, что в данном методе томографии пациент получает более высокую дозовую нагрузку, за счет получения как анатомического (КТ), так и функционального (ПЭТ) изображения есть возможность коррекции данных ПЭТ алгоритмически (учет рассеяния позитронов и затухания сигнала), что позволяет существенно улучшить качество томограммы.

Таблица 2: Основные радионуклиды, применяемые в ПЭТ [3,5].

Радионуклид	$T_{1/2}$	Метод получения	Тип распада	Продукт распада	E_{β^+max} , МэВ	Пробег β^+ в H_2O , мм
^{11}C	20,4 мин	$^{14}N(p,\alpha)^{11}C$	β^+ (100%)	^{11}B	0,960	1,2
^{13}N	10,0 мин	$^{16}O(p,\alpha)^{13}N$	β^+ (100%)	^{13}C	1,199	1,8
^{15}O	2,0 мин	$^{14}N(d,n)^{15}O$	β^+ (100%)	^{15}N	1,732	3,0
^{18}F	109,8 мин	$^{18}O(p,n)^{18}F$ $^{20}Ne(d,\alpha)^{18}F$	β^+ (97%) ЭЗ (3%)	^{18}O	0,634	0,6
^{62}Cu	9,7 мин	Генератор $^{62}Zn/^{62}Cu$	β^+ (98%) ЭЗ (2%)	^{62}Ni	2,94	
^{64}Cu	12,7 ч	$^{64}Ni(p,n)^{64}Cu$	β^+ (61%) β^- (39%)	^{64}Ni , ^{64}Zn	0,653	0,7
^{68}Ga	67,6 мин	Генератор $^{68}Ge/^{68}Ga$	β^+ (89%) ЭЗ (11%)	^{68}Zn	1,899	3,5
^{76}Br	16,0 ч	$^{76}Se(p,n)^{76}Br$	β^+ (55%)	^{76}Se	3,382	

Радионуклид	$T_{1/2}$	Метод получения	Тип распада	Продукт распада	E_{β^+max} , МэВ	Пробег β^+ в H_2O , мм
			$\Xi\Xi$ (45%)			
^{82}Rb	1,3 мин	Генератор $^{82}Sr/^{82}Rb$	β^+ (100%)	^{82}Kr	3,378	7,1
^{86}Y	14,7 ч	$^{86}Sr(p,n)^{86}Y$	β^+ (100%)	^{86}Sr	1,221, 1,545, 1,988	1,9, 2,8, 3,7
^{89}Zr	3,3 д	$^{89}Y(p,n)^{89}Zr$	β^+ (23%) $\Xi\Xi$ (68%)	^{89m}Y	0,902	1,3
^{124}I	4,2 д	$^{124}Te(p,n)^{124}I$	β^+ (26%) $\Xi\Xi$ (74%)	^{124}Te	2,138, 1,535	4,4, 2,8
^{152}Tb	17,5 ч	$^{143}Nd(^{12}C, 5n)^{152}Tb$ $^{144}Nd(^{12}C, 4n)^{152}Tb$ $^{143}Nd(^{12}C, 3n)^{152}Tb$	β^+ (17%) $\Xi\Xi$ (83%)	^{152}Gd	2,968	

Среди перечисленных радионуклидов заслуживают отдельного внимания ^{11}C , ^{13}N и ^{15}O , так как эти элементы входят в биологически важные органические соединения, что дает нам возможность пометить практически любое соединение, осуществляющее определенную функцию в организме. Однако, периоды полураспада этих радионуклидов накладывают существенные ограничения на их использование. Одним из наиболее широко распространенных в клинической практике ПЭТ изотопов является ^{18}F . Несмотря на то, что данный элемент не является биогенным, он используется в составе 2-фтор-2-дезоксид-Д-глюкозы ($[^{18}F]ФДГ$) как биомаркер для томографического исследования мозга и раковых опухолей в связи с высоким потреблением глюкозы данными тканями и, как

следствие, высоким накоплением [^{18}F]ФДГ в них. ^{18}F считается одним из наиболее подходящих для ПЭТ радионуклидов в том числе из-за низкой энергии образующихся позитронов и, как следствие, малого пробега в ткани и высоким разрешением конечной томограммы [8]. Однако, приведенные радионуклиды не являются во всех отношениях оптимальными: они требуют ковалентного связывания в молекулу биологически важного вещества, что в некоторых случаях может занимать длительное время и не является приемлемым при работе с короткоживущими изотопами [9]. Более универсальным подходом является использование радиоизотопов металлов, которые будут образовывать комплексные соединения с хелатором, который в свою очередь соединен с биологическим вектором.

Из приведенных выше изотопов стоит также отдельно рассмотреть ^{64}Cu , который благодаря своим ядерно-физическим характеристикам может применяться как в диагностических (β^+ -излучатель, 61%), так и в терапевтических целях (β^- -излучатель, 39%). Такой двойственный подход в ядерной медицине называется тераностикой (theranostics, совмещение слов therapy и diagnostics) [10]. В ряде работ помимо использования в ПЭТ был изучен терапевтический потенциал данного радионуклида [11–14]. Кроме того, окислительно-восстановительные свойства меди и его способность находиться как в степени окисления +2, так и в степени окисления +1, а также способность отдельных соединений проникать через гематоэнцефалический барьер (например, Cu-ATSM [15,16]) дают возможность применять ее соединения в исследовании патологий, связанных с локальной гипоксией, таких как болезнь Альцгеймера и некоторые виды онкологических заболеваний [17–20].

1.1.2 Терапевтические методы

Деструктивное действие ионизирующего излучения на биологические ткани используется для поражения нежелательных новообразований в организме. По типу воздействия такие методы можно разделить на методы с использованием внешних и внутренних источников излучения. В первом случае используют интенсивное γ -излучение высокой энергии, например сфокусированное излучение от множества источников ^{60}Co (т.н. γ -скальпель или γ -нож). Однако, к существенным недостаткам такого метода относится поражение не только опухоли, но и здоровых тканей, а

также существенная дозовая нагрузка на весь организм в целом [1]. Кроме того, такой подход не может обеспечить уничтожение метастатических образований на поздних стадиях заболевания [21]. Поэтому предпочтительным методом представляется направленная доставка радионуклида в пораженную ткань, то есть введение источника ионизирующего излучения непосредственно в организм. В таком виде терапии онкологических заболеваний применяются главным образом радионуклиды, являющиеся α -, β -излучателями или эмиттерами электронов Оже. В связи с малой длиной пробега частицы и, в то же время, высокой линейной передачей энергии [22] α -частицы, так же как и электроны Оже, имеют существенно меньший пробег в ткани, чем β -частицы (до 100 мкм против 0,5-12 мм). Это способствует минимальному поражению здоровых тканей и, как следствие, наиболее эффективному использованию радиофармпрепарата на основе изотопов, испускающих частицы с коротким пробегом, в том числе распадающихся путем α -распада [5]. Кроме непосредственного разрушения клеток ионизирующим излучением радионуклидная терапия также может иметь эффект в связи с повреждением сосудистой системы опухоли, что впоследствии ведет к плохому снабжению данной ткани кислородом и веществами необходимыми для ее роста, что ведет к ее гибели [23].

Действие терапевтического радиофармпрепарата в большинстве случаев основано на ядерно-физических свойствах входящего в его состав радионуклида. Стоит отметить, что радиотерапия существенно менее распространена, чем радионуклидная диагностика: около 95% радиофармпрепаратов используются в диагностических целях, и только 5% – в терапии [24], однако терапевтическое использование радионуклидов при введении источника ионизирующего излучения в организм пациента изучалось с самого становления радиохимии [25]. Так, в 1903 году впервые было предположено использование радия для терапии онкологических заболеваний, а в 1939 году было впервые описано первое терапевтическое использование искусственного радионуклида ^{32}P [3].

Как и в случае с диагностическими радионуклидами, изотопы, потенциально применимые в радиотерапии, должны обладать периодом полураспада, сопоставимым с временем проведения процедуры, и подходящим типом излучения. Кроме того, необходимо учитывать ядерно-физические характеристики дочерних продуктов распада [25]. При этом дополнительное γ -излучение может позволить

проводить одновременное сцинтиграфическое исследование для контроля распределения препарата по организму, а также проводить предварительную дозиметрическую оценку [1]. Характеристики некоторых радионуклидов, представляющих интерес с точки зрения радиотерапии, приведены в табл. 3.

Таблица 3. Характеристики некоторых радионуклидов, представляющих терапевтический интерес [5,26,27].

Радионуклид	$T_{1/2}$	Тип распада	E_{β^-} , max , кэВ	E_{α} , max , кэВ
^{67}Cu	2,6 д	β^- (100%)	561,7	—
^{90}Y	2,7 д	β^- (100%)	2280,1	—
^{103m}Rh	0,9 ч	$\Xi\Xi$ (100%)	—	—
^{105}Rh	35,4 ч	β^- (100%)	566	—
^{131}I	8,0 д	β^- (100%)	606,3	—
^{177}Lu	6,7 д	β^- (100%)	498,3	—
^{186}Re	3,7 д	$\Xi\Xi$ (7,5%) β^- (92,5%)	1071,5	—
^{188}Re	17 ч	β^- (100%)	2120,42	—
^{211}At	7,2 ч	α (41,8%) β^+ (58,2%)	—	5869,5
^{212}Bi	1,0 ч	α (36%) β^- (64%)	2252	—
^{213}Bi	0,76 ч	α (2,2%) β^- (97,8%)	1420	—
^{223}Ra	11,4 д	α (80%) $\Xi\Xi$ (20%)	—	5716,2
^{225}Ac	10 д	α (100%)	—	5830

Стоит отметить, что наличие у некоторых элементов изотопов, пригодных как к терапевтическому, так и к диагностическому применению дает возможность применять их в тераностике. Так, химически идентичные препараты, но содержащие разные изотопы, возможно использовать как в ПЭТ или ОФЭКТ, так и в направленной радиотерапии. Примерами таких изотопов, кроме описанного выше

^{64}Cu , в ядерно-физических свойствах которого сочетаются подходящие характеристики для тераностики, являются пары $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$, $^{60,61,62,64}\text{Cu}/^{66,67}\text{Cu}$, $^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$ [27,28].

Отдельные терапевтические радионуклиды при распаде образуют дочерний радионуклид, также обладающий подходящими для медицинских применений свойствами, образуя тем самым *in vivo* генератор. Так, ^{225}Ac при трех последовательных реакциях α -распада образует ^{213}Bi , распадающийся до ^{209}Pb , который в свою очередь распадается путем β -распада, ^{212}Pb – до ^{212}Bi , а дочерние продукты ^{223}Ra образуют цепь ядерных реакций с каскадным испусканием α - и β -частиц [29].

1.2 Лиганды, применимые в радиофармпрепаратах

Как было отмечено выше, при разработке потенциального радиофармпрепарата важно учитывать биораспределение элемента. Использование комплексных соединений с металлами открывает возможность направленной доставки радионуклида в исследуемую область путем хелатирования с конъюгатами лиганд-вектор. Необходимость использовать лиганд вместо прямого образования соединения с вектором обуславливается неспособностью последнего связать катион в устойчивый комплекс, что приводит к его высвобождению в организме, а также может привести к накоплению радионуклида в здоровых органах и тканях.

Комплексы, которые применяются в радиофармпрепаратах, должны удовлетворять следующим требованиям:

1. Термодинамическая стабильность. В связи с тем, что при введении препарата в организм его концентрация в крови составляет порядка $10^{-8} \div 10^{-6}$ М, как следствие, повышается его склонность к диссоциации, поэтому для снижения вероятности высвобождения катиона значения констант устойчивости комплексов должны быть как можно больше. Стоит однако иметь в виду, что определение термодинамических параметров для комплекса проходит в модельных условиях, далеких от реальных условий в живом организме, поэтому вычисление констант устойчивости является лишь первичной оценкой, величины констант устойчивости также не могут служить для предсказания стабильности комплекса в условиях живого организма [30].

2. Кинетическая устойчивость. При инъекции препарата могут происходить конкурирующие процессы перехелатирования лигандом других катионов, находящихся в организме (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и другие) в сравнимых с радионуклидом или даже намного больших концентрациях. Кроме того, конкурирующие реакции будут идти и с другими комплексодами, находящимися в биологических жидкостях (сывороточные белки, ферменты, фосфат- и гидроксид-анионы). Для оценки кинетической устойчивости соединений в таких многокомпонентных системах проводят предварительные эмпирические эксперименты по связыванию радионуклида из комплекса сывороточными белками, а также анализируют распределение препарата на здоровых мышах *in vivo* [30].
3. Подходящие условия синтеза комплекса. Вследствие того, что радионуклиды, используемые в ядерной медицине, как правило, характеризуются короткими периодами полураспада, длительный синтез будет приводить к излишней потере радиоактивности препарата, поэтому комплекс должен образовываться как можно быстрее. Кроме того, необходимо соблюдать условия, необходимые для последующего введения в организм (концентрация, pH, объем вводимого препарата). Векторы также накладывают свои ограничения: высокие температуры могут привести к денатурации или гидролизу пептидного вектора, а при использовании моноклональных антител и их фрагментов невозможно использовать температуры синтеза выше 37°C.

Лиганды, используемые в ядерной медицине, можно условно разделить на два основных класса — ациклические и макроциклические. Как правило, макроциклические лиганды проявляют большую кинетическую стабильность, даже в случае схожих термодинамических свойств, однако, ациклические лиганды связывают ионы металлов существенно быстрее, чем макроциклические лиганды [30–32]. Кроме того, в макроциклических лигандах координирующие донорные атомы уже имеют частичную геометрическую предорганизацию, вследствие чего при хелатировании уменьшение энтропии происходит в меньшей степени, чем для ациклических, что приводит к лучшей термодинамической стабильности [30,33]. С другой стороны, ациклические лиганды формируют комплекс существенно быстрее и при более низких температурах: для них характерно связывание центрального

атома меньше чем за 15 минут при комнатной температуре, в то время как большинство макроциклов требуют от 30 до 90 минут при 60–95°C [30,34].

Помимо этого важно проводить исследование термодинамической устойчивости соединения, а также стабильности соединения *in vitro* и *in vivo*. Наиболее часто для исследования стабильности радиофармпрепарата *in vivo* проводят эксперименты по биораспределению комплекса без вектора в организме здоровой мыши. Показано, что в случае прочной координации иона металла лигандом соединение быстро выводится через почки или пищеварительную систему в зависимости от метаболизма или полярности соединений. При этом в случае введения радионуклида в составе нестабильных комплексов происходит накопление в органах, специфических для соответствующих свободных катионов: например, Zr^{4+} и лантаниды будут накапливаться в костях, а Cu^{2+} – в печени [35].

В связи с этим одной из основных задач при создании таргетного радиофармпрепарата является подбор лиганда, достаточно прочно хелатирующего катион металла и, в то же время, способного связываться с вектором в устойчивую молекулу. Ниже будут рассмотрены основные типы лигандов, исследованных с целью применения в качестве хелатора радионуклида в составе радиофармпрепаратов.

1.2.1 Макроциклические лиганды

При обсуждении макроциклических лигандов в первую очередь стоит обратить внимание на азот-содержащие макроциклы в связи с тем, что трехвалентный азот является основанием Льюиса и, как следствие, эффективной хелатирующей группой. Основным из применяемых на данный момент лигандом является 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA, рис. 3). Этот лиганд является «золотым стандартом» для многих медицински важных радионуклидов, в том числе для ^{111}In , ^{177}Lu , $^{86/90}Y$, ^{225}Ac , ^{213}Bi и $^{44/47}Sc$ [30]. Данный лиганд является октадентатным, что позволяет ему координировать в том числе крупные катионы тяжелых металлов. Так, например, катион висмута при хелатировании образует комплекс с геометрией искаженной квадратной призмы [36], при этом в образовании связей участвуют 4 азота из макроцикла, а также 4 кислорода из карбоксильных групп (рис. 4а). При образовании комплексов с катионами с меньшим координационным числом некоторые карбоксильные группы могут не участвовать

в связывании центрального атома. Так, комплексы меди и многих других переходных металлов образуют искаженный октаэдр в качестве координационного полиэдра [37] (рис. 4), при этом две из четырех карбоксильных групп остаются несвязанными с катионом металла. При образовании октаэдрического комплекса карбоксильные группы находятся в цис-ориентации друг к другу в координационном полиэдре.

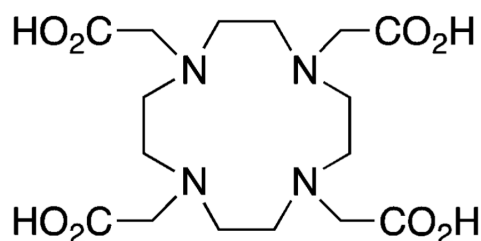


Рисунок 3. 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA).

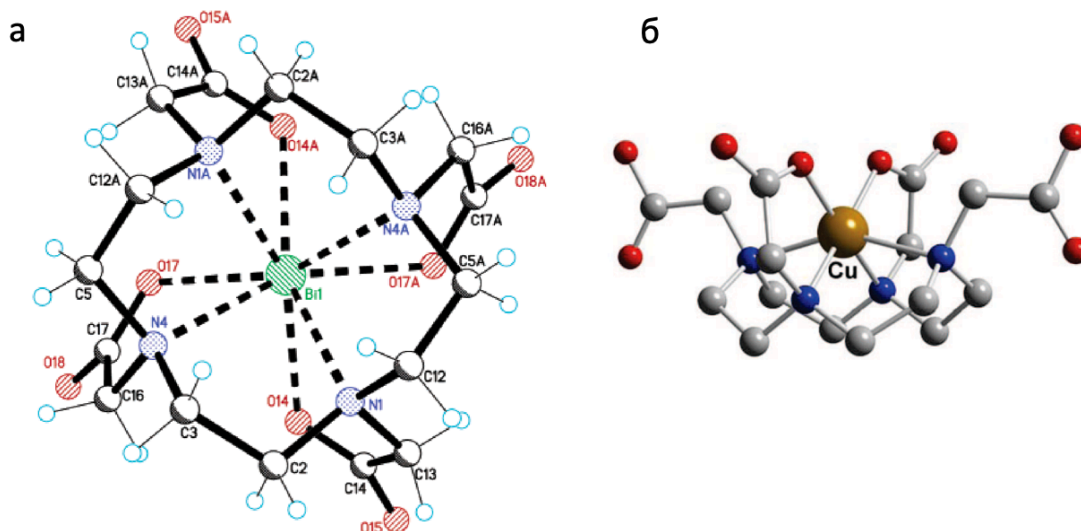


Рисунок 4. Комплексы висмута (а) и меди (б) с DOTA [36,37]

В процессе дизайна бифункциональных лигандов кроме устойчивости комплексов необходимо также учитывать, каким именно образом он впоследствии будет связываться с вектором. При этом при образовании конъюгата необходимо обеспечить сохранение координационной сферы, таким образом донорные атомы, участвующие в комплексообразовании, не могут быть использованы для конъюгирования. В случае DOTA используются два основных подхода к образованию конъюгатов: через карбоксильную группу и через один из атомов углерода в макроцикле [34,38–40]. Примеры функционализированных производных

этого лиганда приведены на рис. 5. Такая функционализация позволяет с одной стороны сохранить дентатность лиганда, с другой – облегчит связывание с векторами: в представленных на рис. 5 производных содержатся амидные (DOTAGA, R-амид), имидные (DOTA-NHS-ester), карбоксильные (DOTAGA(t-Bu)₄), ангидридные (DOTAGA-ангидрид), аминные (PA-DOTA) и тиоцианатные (p-SCN-Bn-DOTA) фрагменты, через которые образуются устойчивые пептидные или аналогичные им связи с вектором. При этом в ходе конъюгирования воздействие вектора на координационный центр минимально.

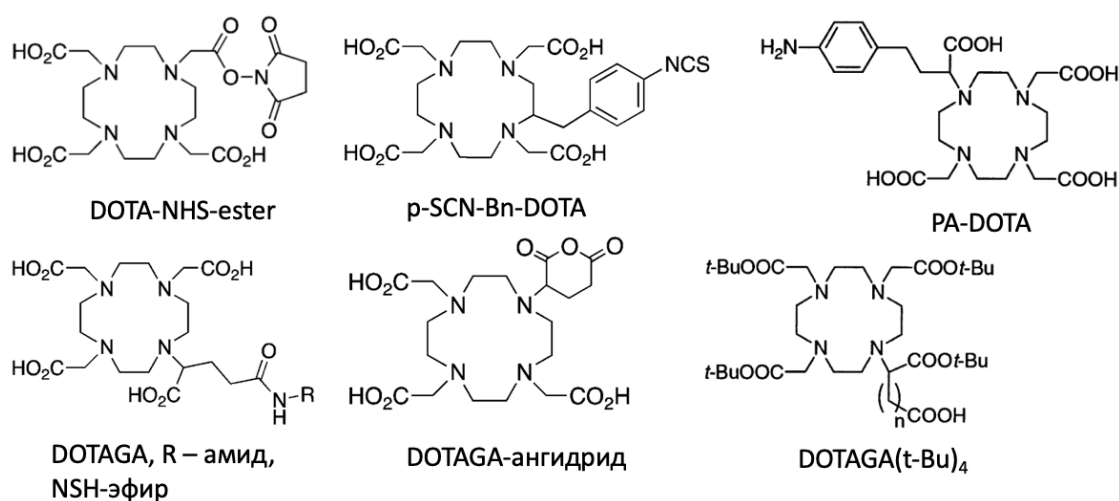


Рисунок 5. Примеры функционализированных производных DOTA [30,39]

Как было отмечено выше, лиганд DOTA и его производные довольно медленно образуют комплексы. Это связано с медленным переформированием макроцикла при создании координационного полиэдра. Кроме того, показано, что такая кинетика хелатирования связана с медленным процессом депротонирования аминогрупп и последующим встраиванием центрального атома в макроцикл [41,42].

Другие производные циклена – аналоги DOTA могут иметь дополнительные циклы – «мосты» – в макроцикле (CB-DO2A [43]), другие функциональные группы на месте карбоксильных (например, амидные в TCMC [44]) или другие гетероатомы в цикле (Охо-DO3A [45]) (рис. 6). С помощью такой модификации лиганда изменяются координационные свойства лиганда, что влияет на термодинамические и кинетические свойства комплексов. Так, для лиганда с этиленовым мостом N-(CH₂)₂-N CB-DO2A показано, что его комплекс с ⁶⁴Cu обладает лучшей стабильностью в сыворотке крови и *in vivo* [46], а производные Охо-DO3А,

содержащие один атом кислорода в макроцикле, показали лучшую по сравнению с DOTA кинетику связывания для ^{64}Cu и $^{67,68}\text{Ga}$ [30]. Представленное ниже производное p-NH₂-Bn-Oxo-DO3A также может быть напрямую связано с вектором через пептидную связь. Лиганд 3p-C-DEPA из-за наличия фрагмента, который можно охарактеризовать как ациклический хелатор, показал гораздо более быструю кинетику связывания $^{212,213}\text{Bi}$, а также лучшую стабильность *in vivo* по сравнению с DOTA [47]. Замена карбоксильных групп в DOTA на амидные (лиганд TCMC) приводит к ускорению реакции комплексообразования с ^{212}Pb , а также лучшей стабильности в сыворотке крови и *in vivo* для образовавшихся комплексов [48,49].

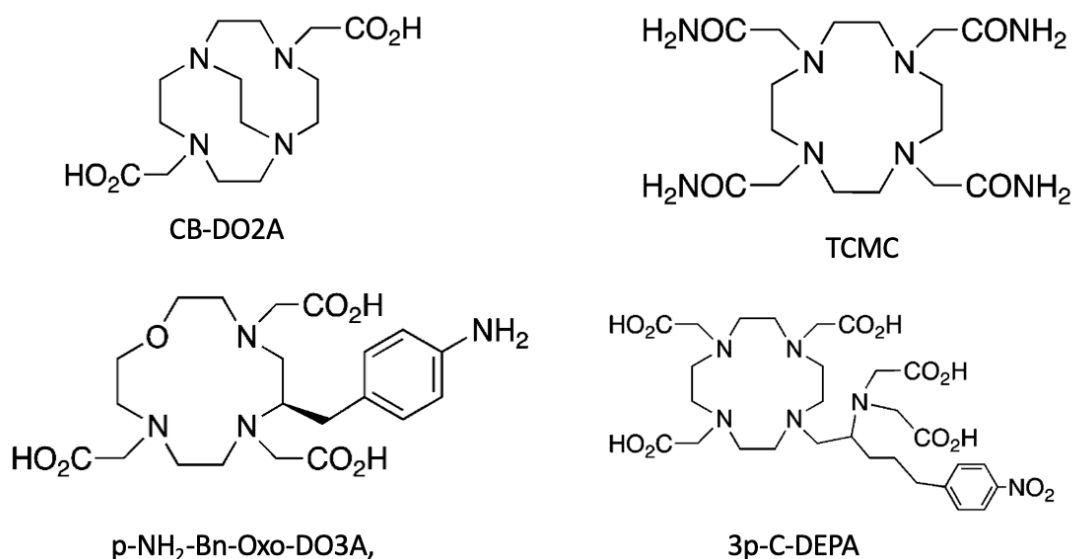


Рисунок 6. Примеры производных DOTA [30].

Лиганд DOTA был функционализирован и конъюгирован с векторами для направленной доставки радионуклида в опухоль. Конъюгаты с DOTA успешно доставляют в опухолевые ткани в условиях *in vivo* соединения ^{67}Ga [50], ^{68}Ga [51], ^{64}Cu [52–54], ^{62}Zn [55], ^{213}Bi [56] и ^{177}Lu [57]. Кроме того, проводились клинические испытания для исследования опухолей с помощью радиофармпрепаратов на основе различных радионуклидов, в том числе ^{64}Cu [58].

В некоторых случаях DOTA используется даже при наличии уже обнаруженных более стабильных комплексов. Так, комплекс ^{68}Ga с 1,4,7-триазаиклононан-1,4,7-триуксусной кислотой (NOTA, рис. 7) более термодинамически стабилен, чем аналогичный комплекс с DOTA. Тем не менее, из-за различия в заряде и других физических свойств, комплекс Ga-DOTA более предпочтителен для использования *in vivo* [59,60]: так, в работе [61] показано, что

отрицательно заряженные конъюгаты имеют профиль распределения отличный от нейтральных, в частности наблюдается меньшее накопление в печени, что является предпочтительной характеристикой при адресной доставке. Этот пример показывает, что при подборе лигандов для применения в ядерной медицине необходимо учитывать целый комплекс факторов.

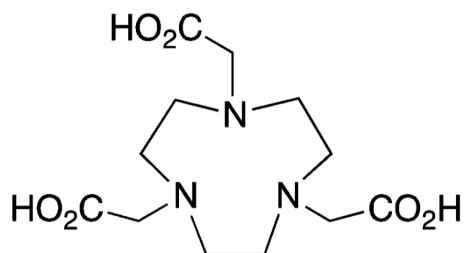


Рисунок 7. Лиганд NOTA

Вышеупомянутый гексадентатный лиганд NOTA, а также лиганды NETA и TACN-TM (рис. 8) являются макроциклами с наименьшим размером полости. Показано, что подобные лиганды демонстрируют более быструю по сравнению с DOTA кинетику комплексообразования с катионами малого радиуса. Так, NOTA образует комплекс при комнатной температуре с галлием за 30–60 минут [30,62], что, однако, является критичным при работе с ^{68}Ga ($T_{1/2} = 68$ мин). В других работах показано, что комплексы ^{64}Cu и ^{68}Ga с конъюгатом NOTA образуются при комнатной температуре в течение 10 минут, которые затем демонстрируют адресное накопление в опухоли *in vivo* в случае мыши с привитой глиобластомой [63]. Сочетание высокой константы устойчивости для комплекса Cu-NOTA ($\lg\beta = 21,6$ [64]), с высокой устойчивостью *in vivo* и быстрой кинетикой связывания позволяют рассматривать данный хелатор с целью его применения в радиофармпрепаратах на основе изотопов меди [30].

NETA, представляющий модифицированный лиганд NOTA, является перспективным хелатором для радиофармпрепаратов на основе $^{86/90}\text{Y}$ в связи с высокой скоростью хелатирования (5–10 минут при комнатной температуре), а также высокой стабильностью образуемого комплекса, превосходящие по этим показателям лиганд DOTA [65]. Лиганд TACN-TM, содержащий SH-группу, также представляет интерес в связи с необычно высокими значениями констант

устойчивости для Ga^{3+} ($\lg\beta=34,2$) и In^{3+} ($\lg\beta=36,1$). Такая стабильность обуславливается эффективной инкапсуляцией катионов в полость макроцикла [37].

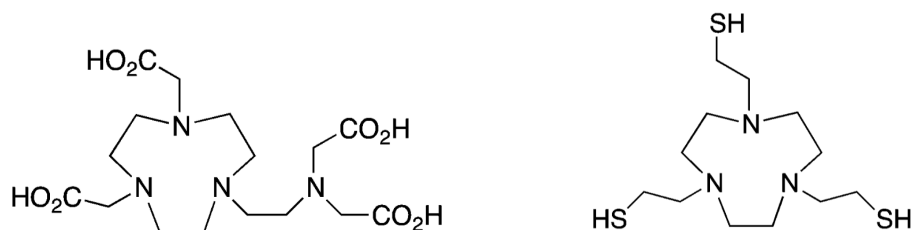


Рисунок 8. Лиганды NETA (слева) и TACN-TM (справа) [30].

Макроциклический лиганд TETA (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота, рис. 9), имеющий ту же дентатность, что и DOTA и два дополнительных атома углерода в макроцикле, проявляет худшую по сравнению с DOTA и NOTA термодинамическую и кинетическую стабильность образуемых комплексов с Cu^{2+} , Ga^{3+} , In^{3+} , Lu^{3+} и Y^{3+} (в том числе в условиях *in vivo*) [30]. При этом есть ряд успешных производных TETA. Так, СВ-TE2A является одним из лучших хелаторов для меди, их комплексы проявляют бóльшую стабильность *in vivo*, чем аналогичные комплексы с DOTA, NOTA и СВ-DO2A [46]. При замещении одной (СВ-TE1A1P) или двух (СВ-TE2P) карбоксильных групп на фосфатные достигается лучшая кинетика связывания радионуклида: с этими лигандами ^{64}Cu связывается больше чем на 95% уже при комнатной температуре в течение 30 минут [66].

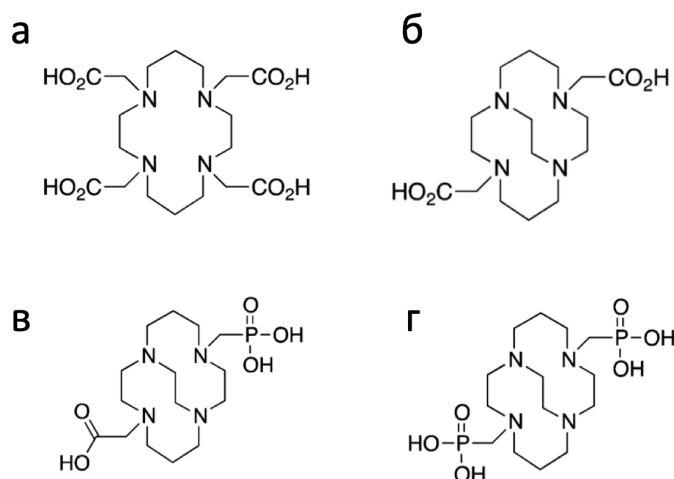


Рисунок 9. TETA (а) и его производные: СВ-TE2A (б), СВ-TE1A1P (в), СВ-TE2P (г) [30].

Другой тип производных основан на замещении при одном или двух атомах азота метильных групп в TETA или TE2A вместо связывания их этиленовым

«мостом». Такие метилированные производные показывают сходную стабильность комплексов и кинетику мечения, как и СВ-TE2A (рис. 10) [67]. Это показывает, что стабильность комплексов СВ-TE2A обусловлена не стерическими факторами, возникающими из-за мостиковой $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ группы, а изменением электронных свойств азота (третичная аминогруппа вместо вторичной).

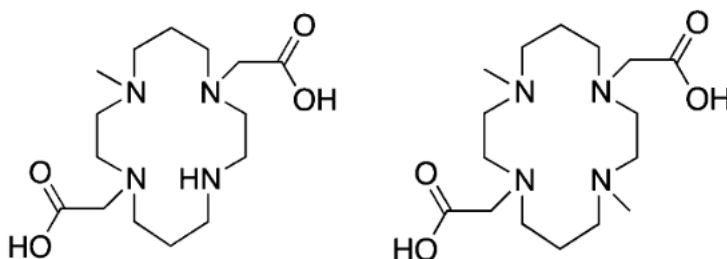


Рисунок 10. Структуры MM-TE2A (слева) и DM-TE2A [67]

Развивая тему бициклических лигандов, нельзя не обратить внимание на производные гексаамин криптанов – diamsar и его производные (рис. 11). Основным их преимуществом является быстрое комплексообразование: с ^{64}Cu комплекс образуется за 5–10 минут при комнатной температуре. Кроме того, получающиеся комплексы проявляют высокую стабильность *in vivo* и в кислых средах [68–70]. Однако, существенным недостатком этих лигандов является липофильность образующихся комплексов из-за отсутствия кислотных групп в составе лиганда. Из-за этого комплексы с ^{64}Cu проявляют склонность к выведению через печень и желудочно-кишечный тракт, что приводит к нежелательному биораспределению. При модификации путем введения двух карбоксильных групп (производное BaBaSar) гидрофильность комплекса повышается, испытания данных лигандов в условиях *in vivo* дают многообещающие результаты [68–70]. Однако, применение данных лигандов в клинической практике остается сомнительным из-за высокой сложности синтеза и, как следствие, высокой стоимости препарата.

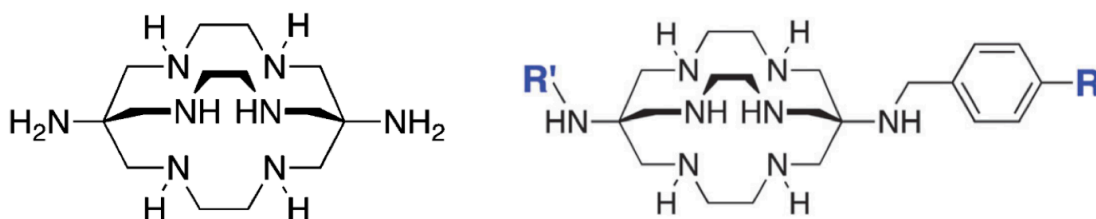


Рисунок 11. Лиганд Diamsar (слева) и его производные: SarAr ($\text{R} = \text{NH}_2$, $\text{R}' = \text{H}$), SarArNCS ($\text{R} = \text{NCS}$, $\text{R}' = \text{H}$), AmBaSar ($\text{R} = \text{COOH}$, $\text{R}' = \text{H}$), BaBaSar ($\text{R} = \text{COOH}$, $\text{R}' = \text{CH}_2-\text{Ph}-\text{COOH}$) [30].

Лиганды с большим количеством атомов в макроцикле, в частности пятнадцатичленный цикл РЕРА [71,72] и восемнадцатичленный НЕНА (рис. 12) [72], исследовались с целью применения для тяжелых металлов в связи с их высокой дентатностью, в частности для ^{213}Bi и ^{225}Ac . Большой размер макроцикла позволяет образовывать комплекс существенно быстрее, чем DOTA. Для этих лигандов также определены термодинамические параметры комплексообразования редкоземельных элементов [73]. Комплекс НЕНА с ^{225}Ac показал хорошую устойчивость *in vivo*, демонстрируя быстрый клиренс и малое накопление в фильтрационных органах. Однако, последующее конъюгирование приводит к значительному снижению устойчивости полученного соединения [74]. Стоит отметить недостаток данных о комплексных соединениях производных больших азакраунов с другими катионами. Учитывая это, поиск новых хелаторов для медицинских радионуклидов в этом направлении представляется перспективным.

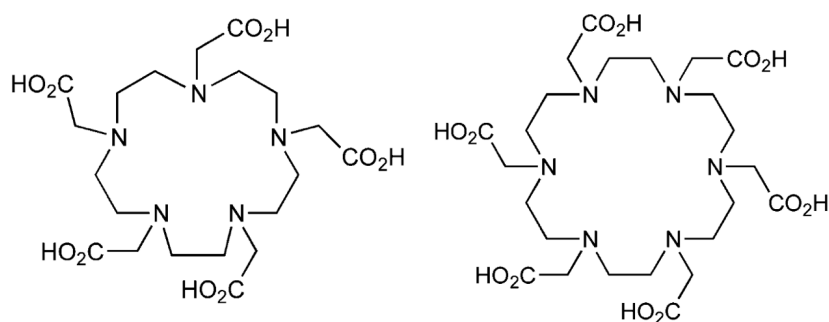


Рисунок 12. Лиганды РЕРА (слева) и НЕНА (справа) [30].

1.2.2 Ациклические лиганды

Как уже упоминалось выше, ациклические лиганды, как правило, образуют менее стабильные комплексы, однако, из-за кинетических факторов их образование идет при более мягких условиях (комнатная температура) и существенно быстрее. При работе с короткоживущими радионуклидами и пептидным вектором эти факторы являются критически важными для получения радиофармпрепаратов.

Одним из наиболее распространенных и изученных лигандов является диэтилентриаминтетрауксусная кислота (ДТРА, рис. 13). Хотя комплексы с ним зачастую не так стабильны, как комплексы с макроциклическими лигандами типа DOTA и NOTA, он нашел применение, в том числе в коммерчески доступных

препаратах для ОФЭКТ (например, ^{111}In OctreoScanTM, производитель – Curium US LLC) [75–78]. Этот лиганд также применялся с ^{64}Cu , ^{177}Lu и $^{86/90}\text{Y}$, однако был вытеснен макроциклическими хелаторами (NOTA и DOTA), образующими более стабильные комплексы [11,79]. DTPA также исследовался в контексте радиофармпрепаратов на основе $^{212/213}\text{Bi}$: данный комплекс демонстрировал очень быструю кинетику мечения, что особенно важно для короткоживущих радионуклидов висмута. Однако, в то же время эти соединения были неустойчивы в условиях *in vivo* [80–82].

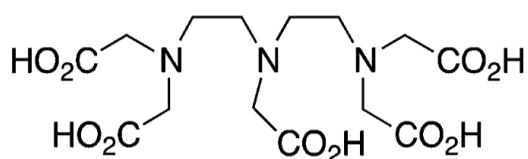


Рисунок 13. Лиганд DTPA.

Функционализация DTPA, как правило, проходит через атом углерода в основной цепи, не затрагивая карбоксильные группы, участвующие в хелатировании (например, бензил-тиоцианатный фрагмент в *p*-SCN-Bn-1B-DTPA, рис. 14б). Производное 1B4M-DTPA (рис. 14в), содержащее помимо бензил-тиоцианатного фрагмента дополнительную метильную группу, нашло также коммерческое применение в терапевтическом препарате Zevalin[®] (Acrotech Biopharma, LLC) на основе конъюгата с ^{90}Y для лечения неходжкинской лимфомы.

Для улучшения координационных свойств DTPA данный лиганд модифицируют с помощью жестких циклогексильных или арильных фрагментов (рис. 14а, г). Так, например, циклогексильный фрагмент в CHX-A''-DTPA и *p*-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA делает молекулу более жесткой, что ведет к предорганизации структуры комплекса, снижению по модулю изменения энтропии и, как следствие, более высоким константам устойчивости комплекса; однако, одновременно это приводит и к замедлению кинетики комплексообразования [30,83].

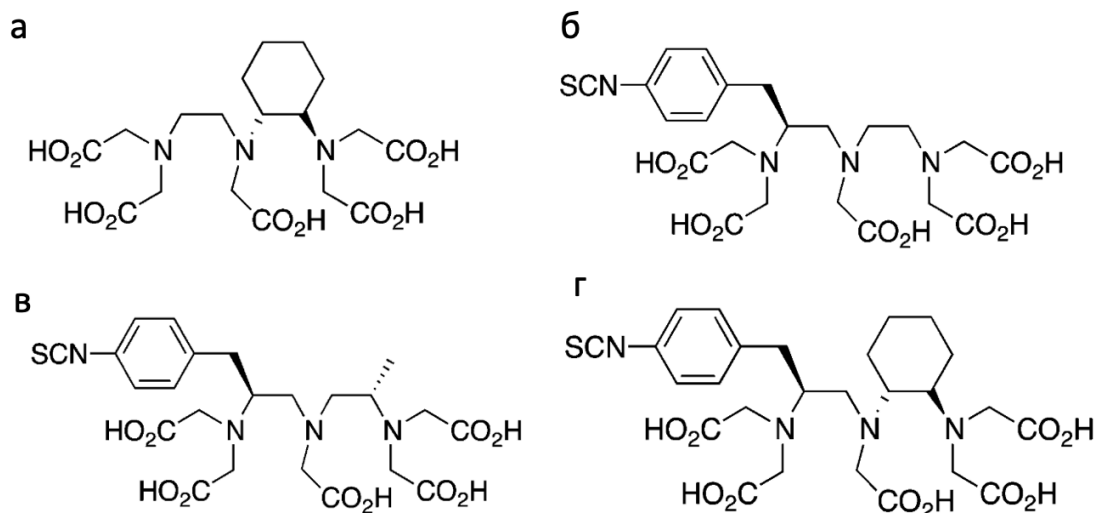


Рисунок 14. Примеры производных DTPA: (а) CHX-A''-DTPA, (б) p-SCN-Bn-1B-DTPA, (в) p-SCN-Bn-1B4M-DTPA, (г) p-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA [30].

В последние годы также изучается семейство ациклических лигандов, включающих фрагменты пиколиновой кислоты, таких как H₂dedpa и его производных (рис. 15). К его преимуществам относится сочетание частично предорганизованной структуры за счет пиридиновых фрагментов, что приводит к улучшению термодинамических характеристик комплексов с ним и высокой скорости связывания радионуклида. Так, например, данный лиганд образует комплекс с галлием меньше чем за 10 минут при комнатной температуре [84], в связи с чем изучается мечение этого лиганда и его производных радионуклидами ^{67,68}Ga [85,86]. Кроме того, H₂dedpa и его производные рассматриваются как лиганды для радиофармпрепаратов на основе ⁶⁴Cu в связи с высокой скоростью образования комплексов и их стабильностью в присутствии сывороточных белков крови [87]. Другой аналогичный лиганд, H₄octapa (рис. 15б), имеющий две дополнительные карбоксильные группы, также участвующие в комплексообразовании и тем самым повышающие максимальную денатность до 8, на данный момент представляется одной из лучших альтернатив DOTA для связывания радионуклидов ¹¹¹In для ОФЭКТ и ¹⁷⁷Lu и ⁹⁰Y для терапии в связи с существенно более быстрой кинетикой связывания: комплексообразование происходит в течение 10–15 минут [88,89].

Как и в случае DTPA, повышение устойчивости комплексов с H₄octapa возможно за счет предорганизации структуры циклогексильным фрагментом (H₂CHXdedpa, рис. 15в). В частности в работе [87] показано, что комплексы ⁶⁴Cu более устойчивы к перехелатированию сывороточными белками, чем аналогичные

комплексы, не содержащие циклогексильного фрагмента. Функционализация данных лигандов проходит через алифатический атом углерода в основной цепи (p-SCN-Bn-H₂dedpa, p-SCN-Bn-H₂octapa, рис. 15г и д соответственно).

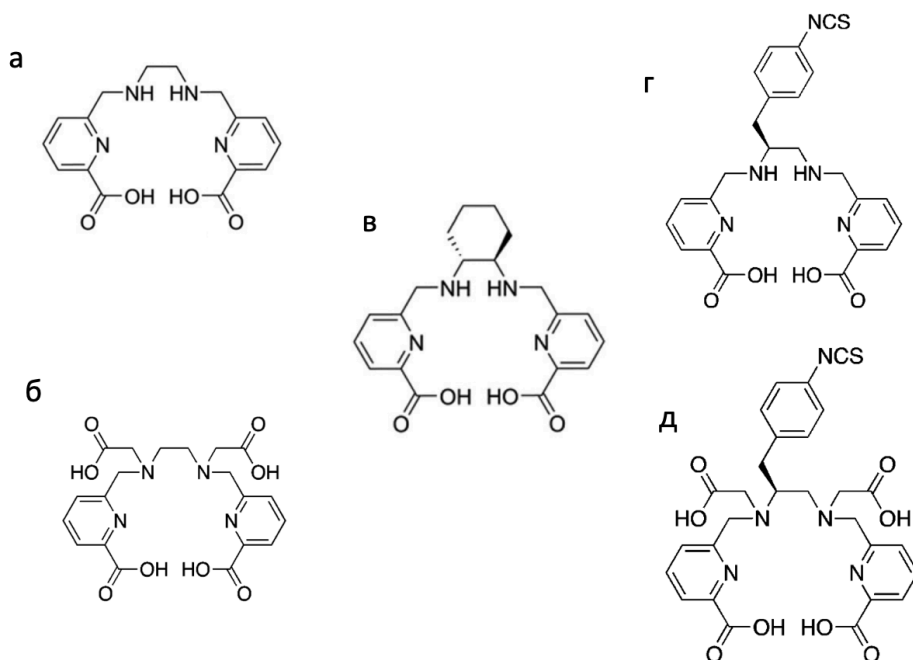


Рисунок 15. Лиганд H₂dedpa (а) и его производные: H₄octapa (б), H₂CHXdedpa (в), p-SCN-Bn-H₂dedpa (г), p-SCN-Bn-H₂octapa (г) [30,84–88].

1.3 Соединения исследуемых металлов в ядерной медицине

Как было отмечено ранее, факторами для выбора радионуклида с целью применения в ядерной медицине является период полураспада, тип распада, а также доступность метода получения изотопа. Для визуализации период полураспада радионуклида должен быть достаточно длинным, чтобы выполнить синтез радиофармпрепарата и достаточно длинным, чтобы обеспечить накопление в ткани-мишени у пациента. С другой стороны, период полураспада должен быть как можно короче, чтобы ограничить дозовую нагрузку на пациента. Периоды полураспадов изотопов, используемых в ПЭТ и гамма-сцинтиграфии, варьируются от 1,3 мин (⁸²Rb) до нескольких дней (⁶⁷Ga). Желательный период полураспада зависит от времени, необходимого для локализации радиофармацевтического препарата в ткани-мишени. Например, препараты для визуализации сердца или мозга требуют более коротких периодов полураспада, так как они быстро достигают исследуемых

органов, тогда как накопление меченных моноклональных антител часто требует значительно более длительного времени [90].

Основными способами производства радионуклидов являются производство в линейном ускорителе или циклотроне [11,21,91–98] в реакторе [11,21,99,100], а также получение с помощью радионуклидных генераторов [11,21,101–103]. При этом считается, что оптимальным методом получения радионуклидов в клинических условиях является генераторный: генератор состоит из относительно долгоживущего изотопа, который имеет короткоживущий дочерний радионуклид. Дочерний нуклид, как правило, выделяется из генератора с помощью ионнообменной хроматографии или экстракцией. Реакторный метод получения для клинических целей используется реже из-за его труднодоступности. В то же время, несмотря на относительную дороговизну, получение необходимых изотопов с помощью циклотрона или линейных ускорителей является одним из основных методов для клинической практики [90].

Несмотря на различные химические свойства, соединения меди, цинка и висмута представляют интерес для изучения с целью применения в ядерной медицине из-за подходящих ядерно-физических свойств их изотопов. Кроме того, представляет интерес сравнительное изучение поведений их комплексов: комплексов меди и цинка в связи с различиями в их электронном строении, приводящим к закономерностям в изменении термодинамических характеристик их соединений (аномалия в ряду Ирвинга-Вильямса [104]), а также сравнение поведения комплексов данных двухзарядных катионов с трехзарядным катионом висмута. Сопоставление с комплексами висмута представляет интерес также в связи с наличием у последнего неподеленной электронной пары, которая может быть стереохимически активной и оказывать влияние на структуру и устойчивость комплексов. Различная жесткость данных катионов с точки зрения ЖМКО создает дополнительный интерес к сравнительному изучению устойчивости образуемых соединений. Ниже рассмотрены основные радиофармпрепараты, содержащие радионуклиды меди, цинка и висмута.

1.3.1 Соединения меди в ядерной медицине

Медицинские радионуклиды меди

Многие изотопы меди подходят для целей ядерной медицины: ^{61}Cu (β^+ , $T_{1/2} = 3.4$ часа), ^{62}Cu (β^+ , $T_{1/2} = 9.41$ мин), ^{64}Cu (β^- , β^+ , $T_{1/2} = 12.7$ часа) и ^{67}Cu (β^- , $T_{1/2} = 62$ часа). Все эти изотопы могут быть получены с помощью циклотронного облучения мишеней, ^{62}Cu в основном получают из генератора $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$. На данный момент наиболее исследуемым является изотоп ^{64}Cu , ввиду удобного периода полураспада, который может быть использован в позитронно-эмиссионной томографии. Уже показано, что препараты на основе ^{62}Cu и ^{64}Cu показывают лучший диагностический эффект, чем существующие на данный момент препараты на основе ^{18}F ФДГ [105] и ^{111}In Octreoscan® [58]. Для получения данного радионуклида можно облучать природный цинк протонами [106] и дейтронами [107] или никель протонами [108], но при данных способах помимо целевого получают другие изотопы меди, а также большое количество побочных продуктов. Обогащение цинка и никеля по изотопу с массовым числом 64 приводит к повышению выхода ^{64}Cu , однако это накладывает экономические ограничения на использование радиофармпрепаратов с этим радионуклидом. Получение обогащенного ^{64}Zn стоит дешевле, чем ^{64}Ni , но удельная активность ^{64}Cu , полученного в циклотроне по реакции $^{64}\text{Zn}(d,2p)^{64}\text{Cu}$ значительно ниже, чем по реакции $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ [109]. В настоящее время в основном используется метод получения ^{64}Cu из обогащенного никеля с помощью циклотрона. Кроме того, существуют коммерчески доступные полностью автоматизированные системы для выделения целевого радионуклида [110–112]. В настоящее время 12 препаратов ^{64}Cu находятся на разных стадиях клинических испытаний [113].

^{67}Cu представляет интерес для тераностики из-за комбинации β^- и γ излучения. Этот изотоп имеет большой период полураспада (61,8 часов), что является благоприятным для терапии, однако на данный момент его использование в терапии не распространено из-за сложного получения [114]. Терапевтические количества ^{67}Cu могут быть получены при облучении протонами по реакции $^{68}\text{Zn}(p,2p)^{67}\text{Cu}$ и $^{70}\text{Zn}(p,\alpha)^{67}\text{Cu}$ [115,116]. Кроме того, возможно получение ^{67}Cu в ядерных реакторах по реакции $^{67}\text{Zn}(n,p)^{67}\text{Cu}$ [117], а также фотоядерными методами по реакции $^{68}\text{Zn}(\gamma,p)^{67}\text{Cu}$ с использованием линейных электронных ускорителей [118].

^{62}Cu , в отличие от других изотопов меди, производится с использованием генератора $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$. Короткий период полураспада делает его пригодным для динамических исследований функций органов. Однако относительно короткий период полураспада родительского радионуклида ^{62}Zn ($T_{1/2} = 9,2$ часа) не позволяет этому генератору работать дольше нескольких дней [102,119]. Кроме того, ядерно-физические свойства ^{62}Zn позволяют использовать его как *in vivo*-генератор ^{62}Cu [29,120].

Изотопы ^{61}Cu и ^{62}Cu подходят по типу распада для использования в ПЭТ, однако испускание β^+ -частиц с различными энергиями для ^{62}Cu и каскада высокоэнергетичных γ -квантов ухудшают разрешение при проведении томографических исследований, тем самым затрудняя получение изображений с оптимальным пространственным разрешением [94,121,122].

Биологическая роль меди

Медь является важным микроэлементом, который является одним из основных катализаторов синтеза гема и поглощения железа, является третьим по распространенности микроэлементом в организме после цинка и железа [123]. В организме здоровой крысы медь распределяется преимущественно в почках (5,1 мкг/г), печени (4,4 мкг/г) и сердце (4,5 мкг/г) [124]. Период полувыведения меди из организма составляет 13–33 дня [125]. При попадании Cu^{2+} в организм человека данный элемент всасывается через слизистую оболочку кишечника и транспортируется кровью в печень. Большая часть того, что поглощается печенью, включается в церулоплазмин, высвобождается в кровь и переносится в ткани. Другая часть меди через желчь выводится в желудочно-кишечный тракт.

Медь – микроэлемент, содержание которого в организме человека составляет приблизительно 72 мг меди (самые высокие концентрации в печени и мозге). Этот элемент действует как восстановитель в ферментах супероксиддисмутаза, цитохромоксидаза, лизилоксидаза, дофамин гидроксилаза и некоторых других оксидазах, которые восстанавливают молекулярный кислород [126]. Ионы меди необходимы для множества биологических процессов, например, для развития соединительной ткани, оболочек нервов и костей. Кроме того, они необходимы в качестве каталитических кофакторов многих ферментов и являются ключевыми структурными компонентами для функциональных белков, играющих

фундаментальную роль в клеточной биологии [127]. В настоящее время утверждается, что в крови ионы Cu^{2+} связаны с белками плазмы, такими как церулоплазмин, альбумин и транскупреин, которые переносят их к внешней клеточной мембране, где они восстанавливаются до ионов Cu^+ ферментами редуктазы, которые затем транспортируются через клеточную мембрану транспортером меди hCTR1, где они впоследствии связываются с трипептид глутатионом, который предположительно ведет себя как первичный акцептор Cu^+ [128]. Хранение и последующее перераспределение ионов меди в другие ткани происходит в основном через печень, следовательно, гепатобилиарная система является наиболее актуальным путем выведения избыточных ионов меди из организма.

Ионы меди также играют ключевую роль в репликации и росте клеток: этот металл связан с различными факторами транскрипции, и связывание меди, как полагают, способствует конформационным изменениям структуры белков, связанным с активацией транскрипции ДНК. Отдельные исследования показывают, что ионы меди также вовлечены в развитие и прогрессирование онкологических заболеваний, и в ряде источников утверждается, что уровень меди в злокачественных новообразованиях повышен [129,130]. Отдельные патологические состояния, такие как синдром Менкса, болезнь Уилсона и многочисленные воспалительные заболевания, также сильно влияют на метаболизм меди [125].

Радиофармпрепараты с радионуклидами меди

Из-за способности ионов меди накапливаться в гипоксических опухолевых тканях, в отдельных исследованиях изучается возможность непосредственного использования свободных катионов меди Cu^{2+} для диагностики и терапии [131]. Результаты, полученные в доклинических исследованиях на животных моделях различных злокачественных новообразований, подтверждают гипотезу о том, что ионы $^{64}\text{Cu}^{2+}$ действительно подходят для молекулярной визуализации и терапии различных видов онкологических заболеваний [132–134]. Эти эксперименты ясно подтвердили, что катионы меди избирательно накапливаются в различных раковых тканях и что, в отличие от ^{18}F ФДГ не участвуют в воспалительных процессах.

Несколько клинических исследований подтверждают доклинические наблюдения. Так, например, при визуализации рака предстательной железы опухоль

была визуализирована в течение 1 часа после введения препарата $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (рис. 16). Эти наблюдения подтвердили, что предыдущие результаты, собранные на животных моделях, также справедливы для людей и что $^{64}\text{Cu}^{2+}$ в несвязанном виде может быть использован в качестве диагностического агента [135].

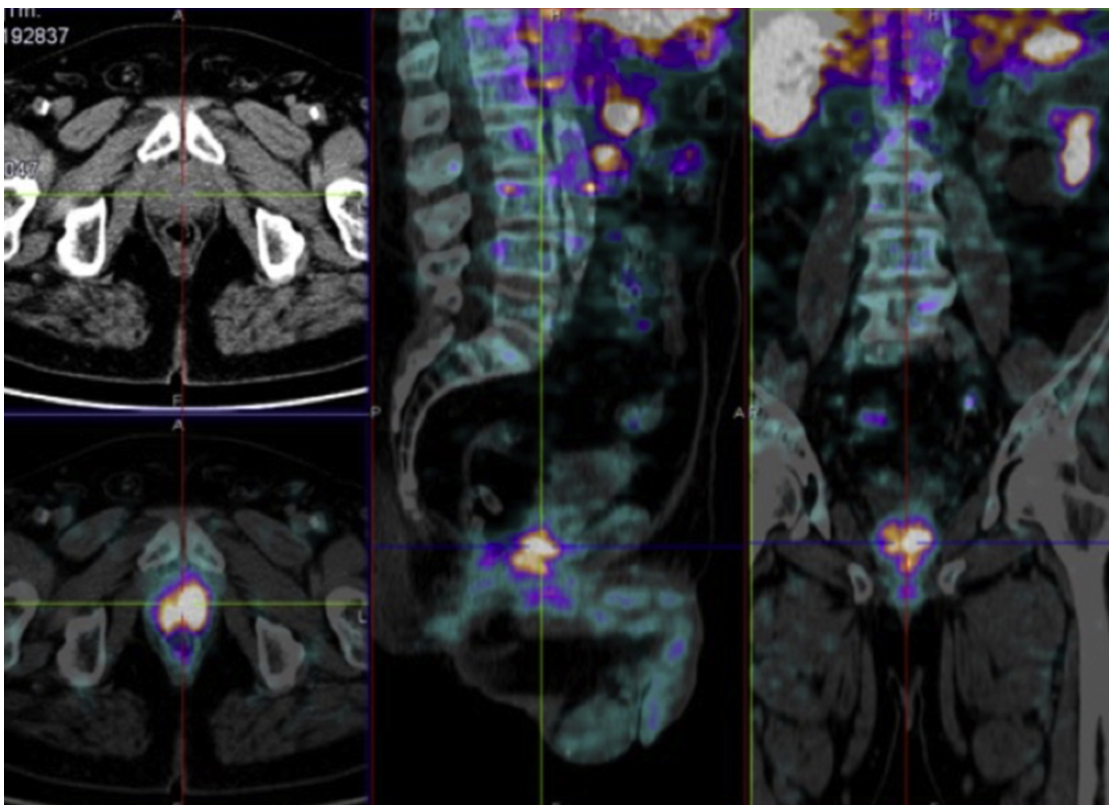


Рисунок 16. Томограмма ПЭТ-КТ мужчины с раком предстательной железы через 1 час после инъекции $^{64}\text{Cu}^{2+}$ [136].

Однако, более перспективным для диагностики и лечения различных видов опухолей представляется использование радионуклидов меди в качестве прекурсора для синтеза радиофармпрепаратов на основе бифункциональных лигандов, соединенных с вектором. В связи с высокой биологической ролью меди в организме необходимо принимать во внимание возможное перехелатирование катиона металла транспортными белками в крови, что сказывается на стабильности препарата. Однако, несмотря на недостатки координационных свойств хелатирующих молекул, диагностические свойства некоторых радиофармацевтических препаратов с медью были оценены в ряде клинических исследований.

В последние десятилетия много исследований посвящено диагностическим средствам, афинным к рецепторам соматостатина, которые сверхэкспрессируются в нейроэндокринных опухолях, а также методам адресной доставки, основанным на

простатическом специфическом мембранном антигене (PSMA). В частности, доклинические исследования по оценке диагностических свойств радиофармацевтического препарата $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -TETA-октреотид (рис. 17) по сравнению с препаратом $[^{111}\text{In}]\text{In}$ -DTPA-октреотидом, используемым в ОФЭКТ, были проведен на небольшой группе из восьми пациентов с нейроэндокринными опухолями [137]. У шести пациентов применение обоих препаратов позволило обнаружить раковые поражения, тогда как у двух пациентов $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -TETA-октреотид обнаружил больше поражений по сравнению с $[^{111}\text{In}]\text{In}$ -DTPA-октреотидом. Однако, в случае радиофармпрепарата на основе ^{64}Cu со временем происходило постепенное накопление радиоактивности в печени, что свидетельствует о высвобождении катиона из комплекса с TETA.

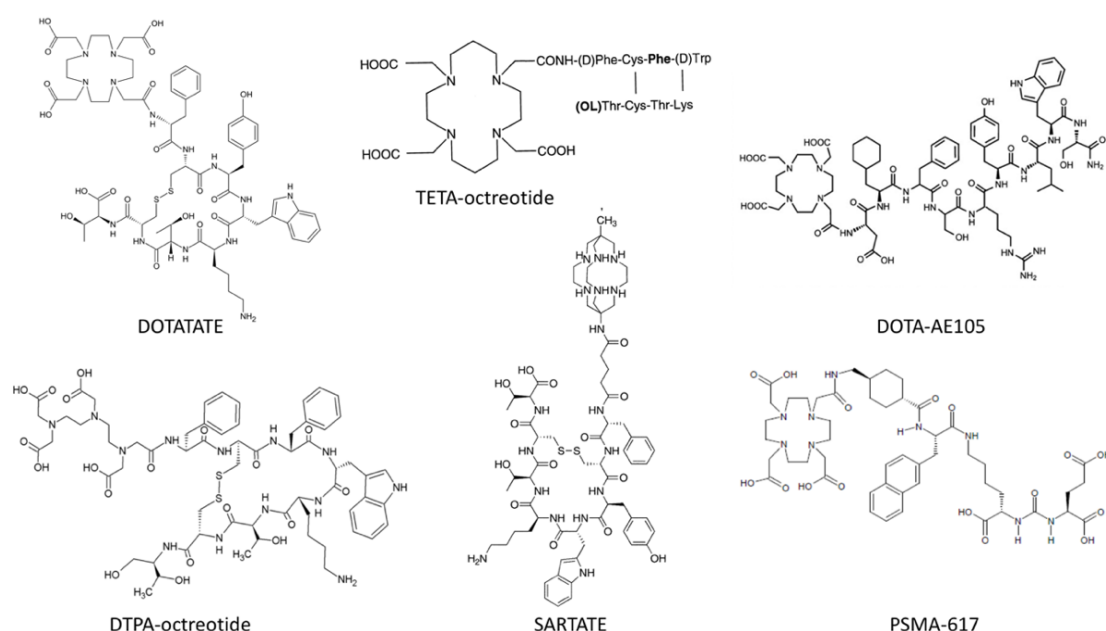


Рисунок 17. Некоторые конъюгаты для использования в радифармпрепаратах с изотопом ^{64}Cu .

В другом исследовании на людях было обнаружено, что $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -DOTATATE (рис. 17) обеспечивает лучшее качество изображения по сравнению с $[^{111}\text{In}]\text{In}$ -DTPA-октреотидом. Тем не менее, хотя стабильность *in vivo* была достаточной для сбора диагностических изображений, позднее увеличение активности в печени было связано с потерей катионов меди из хелатной системы. Расчетные оценки дозы облучения дали эффективную дозу 6,3 мЗв для введенной радиоактивности 200 МБк, при этом печень является органом с самым высоким уровнем поглощённой

дозы (0,16 мГр/МБк). Качество изображения, полученного с $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTATATE}$, было выше, чем с $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-TETA-октреотидом}$, из-за более низкой аффинности последнего к рецепторам соматостатинового типа 2 (sstr2) [58].

В работе [138] проводилось сравнение $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTATATE}$ (рис. 17) и $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTATOC}$, широко используемого в настоящее время в качестве ПЭТ-трейсера для выявления нейроэндокринных опухолей. Существенных различий между чувствительностью двух агентов не было обнаружено. Тем не менее, при использовании $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTATATE}$ пространственное разрешение оказалось немного лучше, что предположительно связано с более низким диапазоном энергий позитронов ^{64}Cu по сравнению с ^{68}Ga . Однако ключевое преимущество $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTATATE}$ обусловлено более длительным периодом полураспада радионуклида ^{64}Cu , который позволяет производить более позднюю визуализацию через 3 часа после инъекции, что является преимуществом по сравнению с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTATOC}$.

Доклинические и клинические исследования также проводятся с $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ (рис. 17), который является аналогом $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTATATE}$, в котором хелатная система заменяется саркофагиновой группой [139]. *In vitro* и *in vivo* эксперименты на животных продемонстрировали его высокую селективность в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих sstr2. Сравнение данных о биораспределении $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ и $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTATATE}$ показало, что оба радиофармацевтических препарата продемонстрировали отличное накопление в sstr2-опухолях через 2 часа после введения. Однако через 24 часа накопление в опухоли $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTATATE}$ значительно уменьшилось, в то время как содержание $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ сохранялось, таким образом улучшая контраст изображения в более поздние моменты времени. Накопление $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ в нецелевых органах, таких как печень и легкие, было ниже. Выведение $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ происходило главным образом через почки. Исходя из этого сделан вывод, что подобные криптантные лиганды способны образовывать комплексы с катионами меди с более высокой стабильностью в живом организме, чем производные DOTA. Подобная координирующая способность способствует их дальнейшему применению для рутинной визуализации через больший промежуток времени после инъекции [140].

Хорошие результаты при клинических исследованиях показал препарат $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-PSMA-617}$ – комплекс конъюгата с лигандом DOTA (рис. 17) для

визуализации рака предстательной железы. В этих исследованиях получили ПЭТ-изображения с высоким разрешением через 1 и 2 часа после инъекции. Опухоли были выявлены у пациентов с раком предстательной железы, подтвержденным с помощью гистологического исследования [141,142]. Клинические испытания препарата [^{64}Cu]Cu-DOTA-AE105 (рис. 17) проходили для пациентов с раком молочной железы, простаты и мочевого пузыря [143], что также позволило четко визуализировать злокачественные новообразования.

1.3.2 Соединения цинка в ядерной медицине

Медицинские радионуклиды цинка

Среди изотопов цинка имеют потенциальное медицинское применение ^{63}Zn (β^+ , $T_{1/2} = 38,5$ мин), потенциал для ПЭТ которого был показан еще в 1974 году [144], а также ^{62}Zn (β^+ , $T_{1/2} = 9.26$ ч), который также используется как генератор для получения ^{62}Cu . Были также попытки применения в медицинских целях ^{65}Zn (β^+ , $T_{1/2} = 243,93$ д), однако большой период полураспада существенно затрудняет его практическое использование [95]. Предпринимались также попытки рассмотрения $^{69\text{m}}\text{Zn}$ (ИП, β^- , $T_{1/2} = 13.76$ ч) в медицинских целях [145–147]. Так, $^{69\text{m}}\text{ZnCl}_2$ предлагалось использовать для сканирования печени [148], а также других органов и тканей [149]. Предлагалось также использовать этот радионуклид для исследования опухолей мозга [150], однако на данный момент эти исследования не доведены до клинического этапа.

^{62}Zn представляет интерес как материнский радионуклид для ^{62}Cu . Выше отмечалось, что генератор $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ возможно использовать для выделения ^{62}Cu , для дальнейшего использования в радиофармпрепаратах для ПЭТ. Однако сам ^{62}Zn можно также вводить в состав препарата, получая тем самым *in vivo* генератор, при этом β^+ -излучение изотопа цинка будет вносить дополнительный вклад в визуализацию [120]. На данный момент разработаны циклотронные способы получения данного изотопа по реакциям $^{60}\text{Ni}(\alpha, 2n)^{62}\text{Zn}$, $^{63}\text{Cu}(p, 2n)^{62}\text{Zn}$ и $^{66}\text{Zn}(p, x)^{62}\text{Zn}$ на соответствующих мишенях [151–153].

Позитронный эмиттер ^{63}Zn , в отличие от ^{62}Zn , распадается до стабильного изотопа ^{63}Cu , что приводит к лучшему разрешению при ПЭТ вследствие отсутствия позитронов с другими энергиями. ^{63}Zn можно получить путем облучения природной

меди протонами в результате реакции $^{63}\text{Cu}(p,n)^{63}\text{Zn}$, которая характеризуется высокими значениями сечений при низких энергиях протонов. Хотя реакция $^{60}\text{Ni}(\alpha,n)^{63}\text{Zn}$ имеет сравнимые сечения, неизбежно также образование химически неотделимого и более долгоживущего ^{62}Zn , что затрудняет ее применение [18].

Невысокая доля β^+ -излучения при распаде ^{65}Zn (1,4 %), в сочетании с большим периодом полураспада ($T_{1/2} = 243,93$ д), ограничивают применение этого изотопа в медицинских целях. Тем не менее в литературе описано несколько случаев применения препаратов с данным радионуклидом в исследовательских целях [154–156]. Однако, стоит отметить, что ^{65}Zn целесообразно использовать для моделирования экспериментов с цинком: заменяя им более короткоживущие изотопы $^{62,63}\text{Zn}$, что позволяет проводить исследования после одного облучения мишени в течение более длительного времени [157].

Биологическая роль цинка

Цинк, как и медь, является биогенным элементом, участвуя в активации около 100 ферментов, например, РНК-полимеразы и карбоангидразы. В организме человека содержится 2–3 г цинка, находясь практически во всех тканях человеческого организма (большая часть, около 85% – в коже и мышцах) и около 1 мг/л в плазме [126]. Попадая в кровь, практически весь свободный цинк связывается с альбумином [158]. Он выполняет каталитическую и структурную роль в ферментах. Ионы цинка существуют в основном в виде комплексов с белками и нуклеиновыми кислотами и участвуют во всех аспектах промежуточного метаболизма, передачи и регуляции экспрессии генетической информации, хранения, синтеза и действия пептидных гормонов [159]. Биохимические свойства цинка обусловлены, в основном, его электронным строением и координационными свойствами [160].

В ряде работ изучался метаболизм цинка с использованием $^{69\text{m}}\text{Zn}$, а также была построена кинетическая модель метаболизма цинка в организме человека [161–163]. Катионы цинка при введении в несвязанном виде задерживаются в организме – период полувыведения составляет 87 дней [161], при этом с течением времени наблюдается его накопление в красных кровяных тельцах.

Радиофармпрепараты с радионуклидами цинка

Препарат [^{62}Zn]Zn-EDDA (лиганд изображен на рис. 18) использовали для функциональной визуализации поджелудочной железы у мышей для исследований ее стимуляции различными веществами. В этих исследованиях показано, что инъекция мышам холецистокинина увеличивала секрецию цинка поджелудочной железой, в то время как глюкоза не вызывала изменений [164].

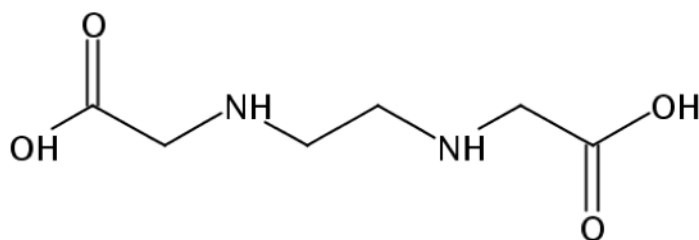


Рисунок 18. Этилендиамин-N,N-диуксусная кислота (EDDA).

^{62}Zn также тестировали как *in vivo* генератор ^{62}Cu в составе комплекса с конъюгатом моноклонального антитела [^{62}Zn]Zn-DOTA-rituximab, однако комплекс оказался неустойчивым в условиях живого организма [55]. Помимо таргетных биомолекул клинически исследовался низкомолекулярный комплекс [^{63}Zn]Zn-цитрат. Для исследования радиофармпрепарат вводили 6 здоровым людям и 6 – с клинически подтвержденной болезнью Альцгеймера. Наибольшее накопление радиоактивности наблюдалось в печени, поджелудочной железе и почках (рис. 19). Поглощение в мозге было умеренным без существенных различий между здоровыми субъектами и пациентами с болезнью Альцгеймера, что в целом говорит о непригодности данного соединения как диагностического для нейродегенеративных заболеваний мозга. Тем не менее, существует разница в скорости клиренса между двумя группами – с более медленным у больных пациентов [165].

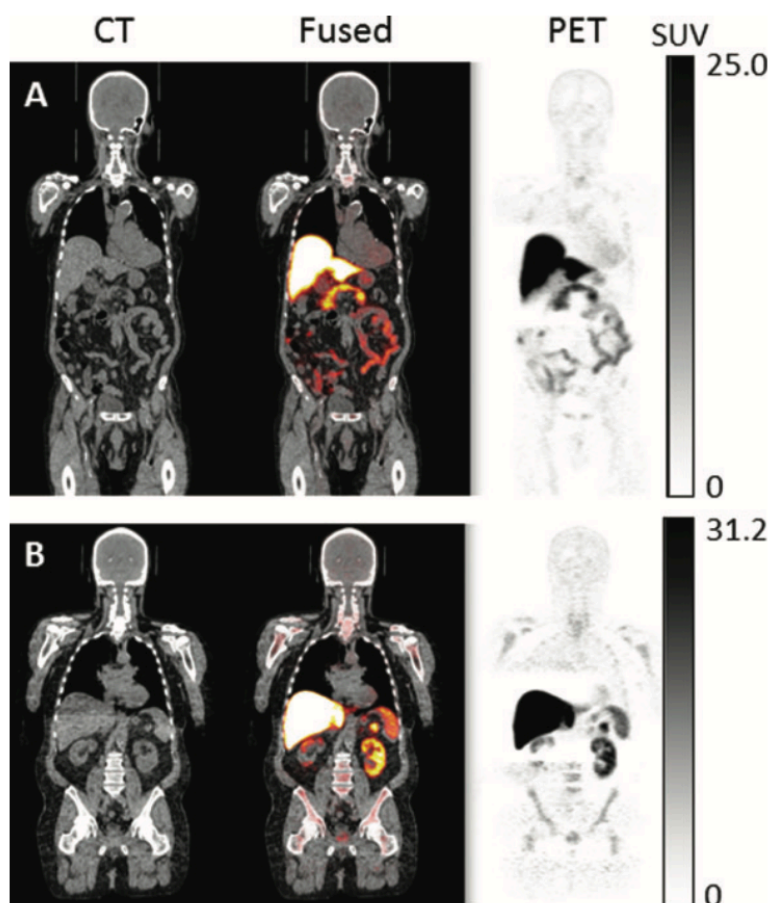


Рисунок 19. Томограмма ПЭТ-КТ у пациента с болезнью Альцгеймера (А) и здорового пожилого участника исследования (В) через 45-70 минут после введения $[^{63}\text{Zn}]\text{Zn}$ -цитрата [165].

Исходя из анализа литературы видно, что соединения цинка довольно слабо изучены с точки зрения применения в ядерной медицине, несмотря на подходящие характеристики его отдельных изотопов. В связи с этим отдельный интерес представляет изучение комплексов цинка как потенциальных компонентов радиофармпрепаратов.

1.3.3 Соединения висмута в ядерной медицине

Медицинские радионуклиды висмута

Среди изотопов висмута для целей ядерной медицины наибольший интерес представляют ^{212}Bi и ^{213}Bi . ^{213}Bi ($T_{1/2} = 46$ мин) распадается преимущественно путем β^- -распада (98%), однако в связи с тем, что дочерний радионуклид ^{213}Po имеет крайне малый период полураспада ($T_{1/2} = 4,2$ мкс) и является альфа-эмиттером, ^{213}Bi

рассматривают в основном как смешанный α/β -эмиттер [101]. Данный радионуклид образуется в результате распада ^{225}Ac , который в свою очередь является дочерним радионуклидом ^{229}Th (схема распада приведена на рис. 20). Генераторный способ получения ^{213}Bi из относительно долгоживущего ^{225}Ac является несомненным преимуществом для использования в клинической практике. К настоящему времени один препарат для терапии острого миелоидного лейкоза, содержащий ^{213}Bi – ^{213}Bi -lintuzumab, прошел фазы I и II клинических испытаний [166].

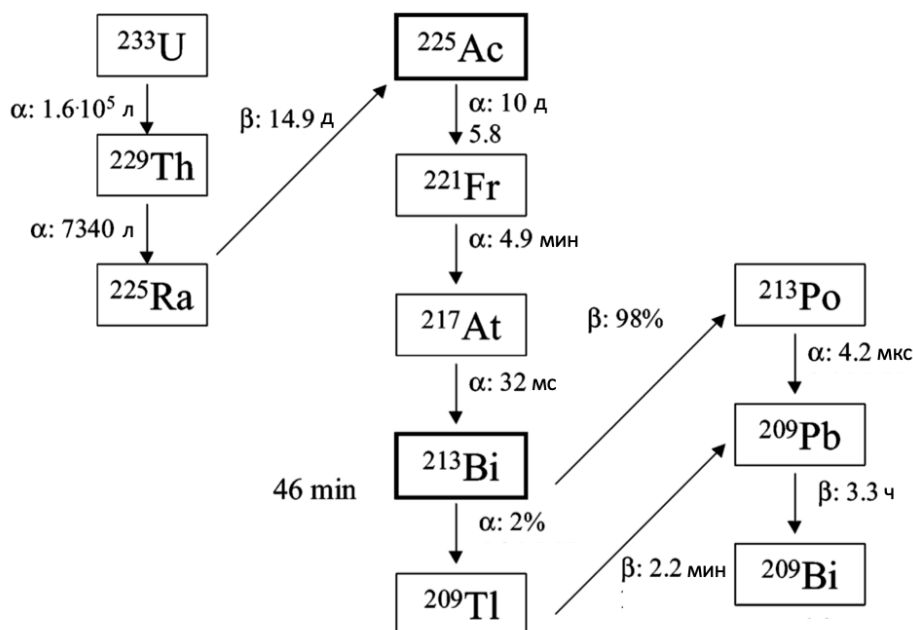


Рисунок 20. Схема распада ^{233}U , одним из дочерних продуктов которой является ^{213}Bi [101]

^{212}Bi ($T_{1/2} = 1.1$ ч) является смешанным α/β -излучателем. На данный момент изучение терапевтического эффекта ^{212}Bi в основном ограничивается клиническими исследованиями таргетного препарата ^{212}Pb как *in vivo* генератора ^{212}Bi . Однако одним из основных препятствий к применению ^{212}Bi является наличие у дочернего ^{208}Tl высокоэнергетического гамма-излучения ($E_\gamma = 2614$ кэВ, $I_\gamma = 99\%$), что, в частности, существенно повышает требования к защите медицинского персонала [28]. Основным способом получения ^{212}Bi является выделение из радионуклидных генераторов $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$ и $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ [30].

Радиофармпрепараты с радионуклидами висмута

Так как висмут является ксенобиотиком, данный элемент не играет роли в жизнедеятельности организма. В связи с этим радиофармпрепараты с радионуклидами висмута возможно рассматривать только в связи с его комплексными соединениями.

Впервые конъюгат ^{213}Bi с моноклональными антителами через производное ДТРА был получен исследователями из Нью-Йорка (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) [167], что позволило затем им проводить клинические испытания препарата на основе аналогичных конъюгатов. На данный момент завершено клиническое испытание фаз I и II препарата на основе ^{213}Bi для терапии миелоидной лейкемии [113], в котором приняло участие 32 пациента старше 65 лет [166]. В данном исследовании использовался препарат, в котором в качестве лиганда использовался конъюгат ациклического лиганда SCN-CHX-A-DTPA (рис. 14) и моноклональных антител lintuzumab. Ранее коллективом данного медицинского центра было показано, что использование конъюгата с данным хелатным лигандом для Bi^{3+} позволяет избежать стадии нагрева реакционной смеси, нежелательной для моноклональных антител, при синтезе радиофармпрепарата: в работе [168] Никула и соавторы показали, что химический выход реакции мечения достигает 80% в течение 5 минут при комнатной температуре. Несмотря на то, что в дальнейшем степень мечения комплекса увеличивается со временем, дополнительное ожидание оказывается нецелесообразным из-за короткого периода полураспада ^{213}Bi : при бóльших химических выходах в итоговом препарате оказывается меньшая радиоактивность из-за распада радионуклида. В данных клинических испытаниях ^{213}Bi -lintuzumab в ряде случаев наблюдалась ремиссия у пациентов. На рис. 21 показаны изображения, полученные с помощью γ -камеры для одного из пациентов, у которого наблюдалась ремиссия после четырех инъекций радиофармпрепарата: если после получения первой дозы явно видно накопление в костном мозге, почках и печени (А и Б), то после четвертой – быстрый клиренс, что говорит об отсутствии пораженных клеток в крови [166].

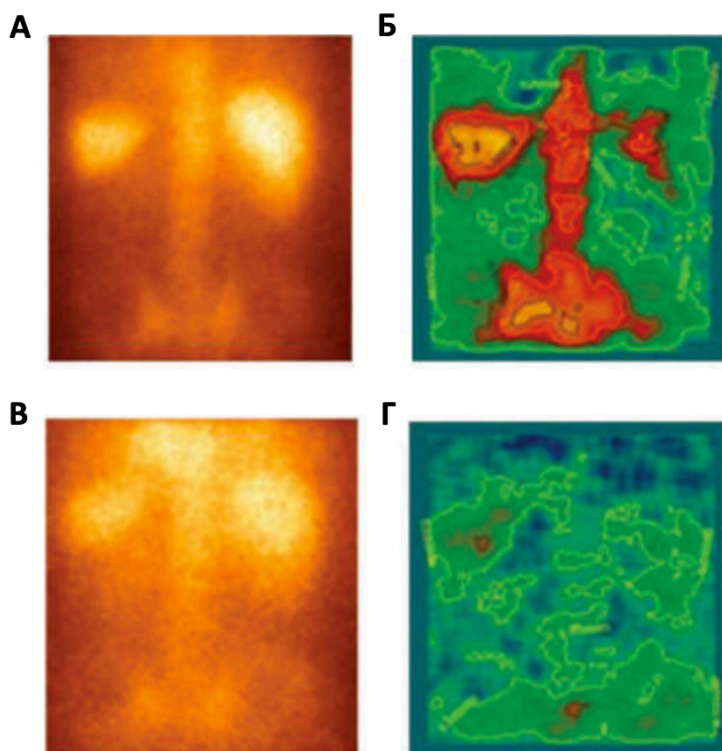


Рисунок 21. Распределение препарата ^{213}Bi -lintuzumab; изображения получены с помощью гамма-камеры после первой (А и Б) и четвертой (В и Г) инъекции препарата [166].

Также были опубликованы пилотные исследования терапии с помощью ^{213}Bi -PSMA-617 (конъюгат с лигандом DOTA) на пациенте с метастазирующим раком простаты, резистентным к традиционным терапевтическим методам [169]. В данной работе человеку вводились 2 дозы препарата с общей радиоактивностью 592 МБк. ПЭТ изображения, полученные с помощью ^{68}Ga -PSMA до терапии и через 11 месяцев после лечения, показывают, что опухолевая ткань практически полностью уничтожена, что показывает перспективность α -терапии с использованием средств направленной доставки радионуклида (рис. 22), однако на данный момент полноценных клинических испытаний с данным препаратом проведено не было. Стоит отметить, что в этом случае для получения изображения и терапии использовался один и тот же лиганд, в котором варьировался только центральный атом в зависимости от цели: ^{68}Ga для получения изображения и ^{213}Bi для проведения терапии.

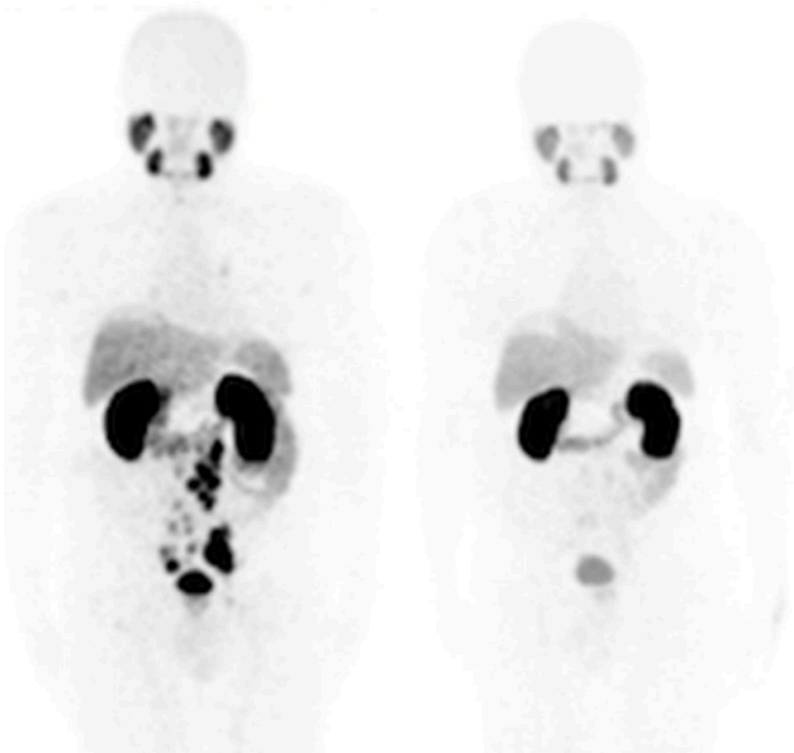


Рисунок 22. ПЭТ-томограмма пациента до терапии ^{213}Bi -PSMA-617 (справа) и через 11 месяцев после терапии (слева) [169].

Комплексы ^{213}Bi и конъюгата DOTATOC испытывались с целью терапии метастазирующих нейроэндокринных опухолей [170]. Как и в предыдущем случае, лиганд при проведении терапии и томографии был одинаков, в препаратах изменяли только катион радионуклида. В отдельных случаях наблюдался долгосрочный противоопухолевый эффект α -терапии (рис. 23): наблюдалось значительное уменьшение метастазов в печени и костях после введения ^{213}Bi -DOTATOC через печеночную артерию. Для данного пациента также стоит отметить, что инъекция вызвала меньшую гематотоксичность, чем терапия с помощью аналогичного препарата на основе ^{90}Y : в ходе терапии ^{213}Bi было уничтожено существенно меньше тромбоцитов, что также подтверждает предпочтительность терапии с помощью α -излучающих радионуклидов по сравнению с β -излучающими из-за малого пробега частиц в тканях.

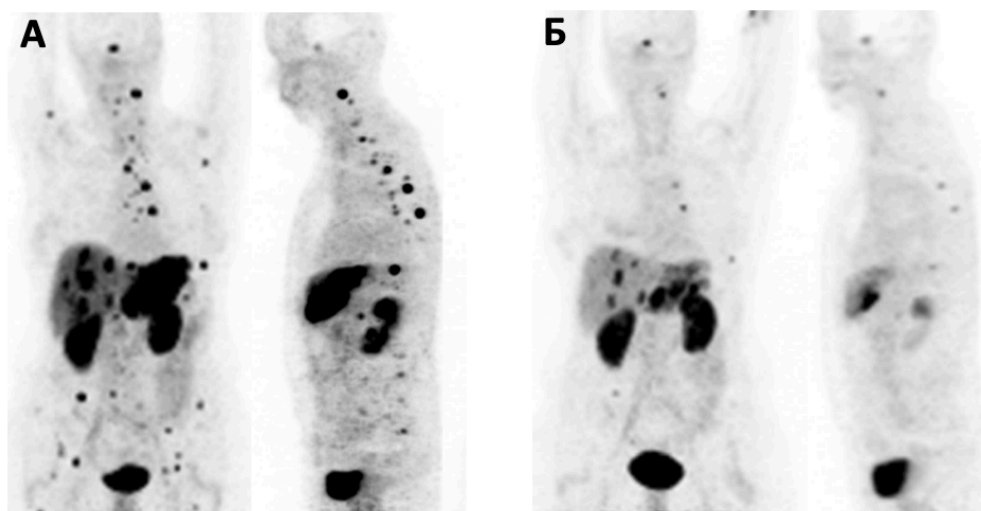


Рисунок 23. ПЭТ-томограммы пациента с метастазирующей примитивной нейроэндокринной опухолью (PNET) до терапии (А) и через 6 месяцев (Б) после инъекции ^{213}Bi -DOTATOC (10,5 ГБк) [170].

Пилотные испытания на пяти пациентах проводились также для конъюгата на основе комплекса ^{213}Bi -DOTA и пептида substance P с целью терапии глиомы головного мозга [56]. В них показана эффективность терапии с использованием ^{213}Bi для малых опухолей и, в то же время, неэффективность при лечении крупных новообразований, что обусловлено малым пробегом альфа-частиц. Стоит отметить, что в данном исследовании препарат вводился в опухоль через катетер напрямую в поражённые ткани мозга из-за невозможности для него преодолеть гематоэнцефалический барьер.

1.4 Заключение из обзора литературы

Для решения различных задач в ядерной медицине используют радионуклиды с различным типом излучения: для диагностических целей применяют γ -излучающие (ОФЭКТ) или распадающиеся с испусканием β^+ -частиц (ПЭТ), в то время как в терапии используют β^- - и α -излучатели. Использование радиофармпрепаратов в большинстве случаев сопряжено с образованием комплексов катиона металла с биологическим вектором через бифункциональный лиганд.

Соединения меди являются одними из наиболее перспективных для применения в радиофармпрепаратах в связи с их подходящими ядерно-физическими свойствами как для диагностики, так и для терапии. Для ряда препаратов с использованием изотопов этого элемента в данный момент также проводятся

клинические испытания. В то же время, комплексы цинка в связи с ядерной медициной весьма слабо изучены, несмотря на важную биологическую роль этого элемента и потенциальную применимость его радионуклидов в диагностике. Кроме того, пара $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ может быть использована в качестве *in vivo* генератора при проведении ПЭТ.

При выборе терапевтических радионуклидов для лечения небольших образований предпочтение стоит отдавать α -излучателям в связи с малой длиной пробега α -частицы и, в то же время, высокой линейной передачей энергии. Также отдельные клинические исследования показывают, что при α -терапии здоровые органы и ткани повреждаются существенно меньше, чем при использовании β -излучателей. Изотопы висмута ^{212}Bi и ^{213}Bi активно изучаются с целью применения в ядерной медицине. Для последнего радионуклида зарегистрировано проведение полноценного клинического испытания, в котором, предварительно, показана успешность проведения α -терапии.

Для ряда изученных лигандов есть практика их применения одновременно и в диагностических, и в терапевтических целях. В то же время, использование одинаковых хелаторов для тераностики может быть затруднено из-за кардинального различия координационных свойств элементов: для α -терапии применимы изотопы тяжелых металлов, обладающих существенно большими ионными радиусами, чем элементы 4–5 периодов, комплексы с которыми используются в диагностических целях. В связи с этим актуальным является разработка лигандов, образующих устойчивые соединения с металлами, проявляющими совершенно различные координационные свойства.

При изучении новых комплексных соединений для применения в радиофармпрепаратах необходимо изучать как термодинамику (устойчивость комплекса), так и кинетику (скорость образования комплекса) в связи со спецификой работы с короткоживущими радионуклидами. Анализ литературы показывает, что макроциклические лиганды характеризуются, как правило, хорошей термодинамической устойчивостью образуемого комплекса, но долгим связыванием радионуклида, в то время как ациклические хелаторы быстро связывают катион, но образуемый комплекс зачастую так же быстро диссоциирует после инъекции препарата, что приводит к нежелательному накоплению излучателя в здоровых органах и тканях. Повышение устойчивости комплексов возможно путем

предорганизации его структуры за счет стерически жесткого фрагмента в составе лиганда (например, циклогексильного фрагмента или бензольного кольца), что приводит к уменьшению энтропийного фактора в реакции комплексообразования и, как следствие, повышению устойчивости как для случая ациклических, так и циклических лигандов.

Среди макроциклических лигандов наиболее подробно исследованы DOTA и его производные. В то же время, исследований комплексообразования азакраун-производных с бóльшим размером макроцикла на данный момент недостаточно, несмотря на ожидаемую высокую скорость связывания за счет большего размера макроцикла и хорошую устойчивость за счет проявления макроциклического эффекта.

Стоит отдельно отметить, что характеристики стабильности координационного соединения, используемого в радиофармпрепаратах, путем только вычисления константы устойчивости недостаточно, так как высокие значения lgK не гарантируют последующей устойчивости в живом организме, в связи с чем необходимо изучать данный фактор в условиях *in vitro* и *in vivo*.

В связи с вышеизложенным, исследование новых комплексов меди, цинка и висмута с производными азакраун-эфиров и их устойчивости (в том числе *in vivo*) представляется важной фундаментальной и прикладной задачей для разработки перспективных радиофармпрепаратов.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Используемые реактивы

Для облучаемых мишеней использовали чистые металлические цинк, медь, никель и галлий. Для приготовления рабочих растворов использовали HCl (конц.), HNO₃ (конц.), HClO₄, NaOH, KNO₃, NaClO₄, Cu(ClO₄)₂, Zn(NO₃)₂ (ч.д.а.) без предварительной очистки. Для приготовления буферных растворов использовали ацетат аммония и 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES). Для работы использовали деионизированную воду (MilliQ, 18,2 МОм). При работе с комплексами висмута в качестве радиоактивной метки использовали рабочий раствор [²⁰⁷Bi]Bi³⁺ в HCl (Ритверц). Для разделения радионуклидов из продуктов облучения мишеней использовали анионообменную смолу Dowex 1x8 (Sigma-Aldrich) и Cu-Resin (TrisKem Int.).

Лиганды, использовавшиеся в ходе данной работы (рис. 24), были синтезированы в Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН в лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем (рук. О.А. Федорова).

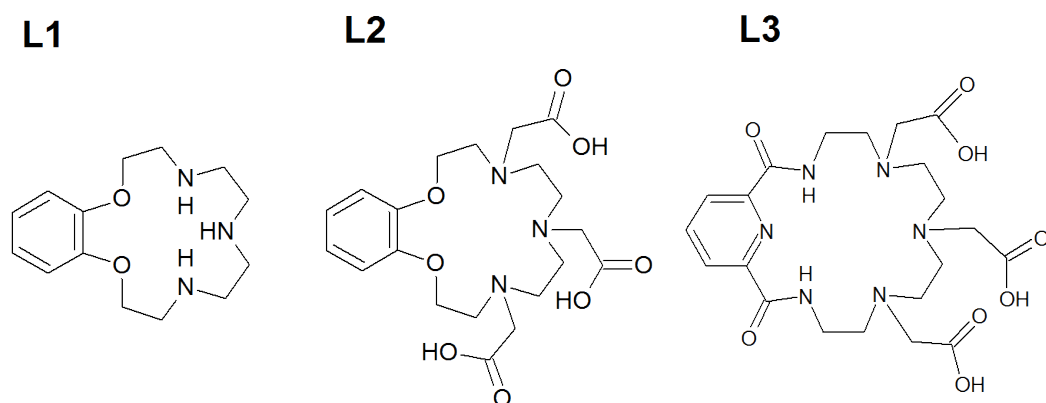


Рисунок 24. Структурные формулы изучаемых лигандов.

Для экспериментов сравнения использовался лиганд DOTA (Sigma Aldrich).

2.2 Инструментальные и расчетные методы

2.2.1 Гамма-спектрометрия

Анализ гамма-спектров проводился с помощью гамма-спектрометра GC-3020 (Canberra Packard Ind., США) с полупроводниковым детектором из сверхчистого германия. Эффективность регистрации детектора для γ -квантов с различными энергиями была определена на основе измерений активности образцовых стандартных источников.

2.2.2 Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия

Жидкостно-сцинтилляционную спектрометрию проводили с помощью спектрометра Perkin Elmer Tri-Carb 2810 TR.

2.2.3 Спектроскопия в УФ-видимом диапазоне спектра

Измерение спектров поглощения растворов в УФ-видимом диапазоне проводилось на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 в пластиковых кюветах в диапазоне 300–1100 нм.

2.2.4 Авторадиография

Для визуального анализа пластин ТСХ проводилась их авторадиография на пластинах из BaFBr, допированного европием, (Multisensitive phosphor screens) с помощью системы Cyclone Plus Storage Phosphor System (Perkin Elmer), анализ полученных изображений осуществлялся с помощью программного обеспечения Optiquant.

2.2.5 Спектроскопия ядерно-магнитного резонанса

^1H -ЯМР-спектры были измерены с помощью спектрометра Bruker DRX-600. В качестве пика сравнения был взят пик растворителя ($\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4,75$ м.д.). Раствор лиганда в D_2O с концентрацией 0,01 М смешивался с раствором 0,01 М $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, после чего непосредственно проводилось измерение спектров.

Измерение спектров ЯМР проводилось сотрудниками Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН.

2.2.6 Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ проводился с помощью дифрактометра Bruker APEXII DUO CCD. Получение дифрактограмм и расчет структуры проводился сотрудниками Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН.

2.3 Получение и выделение радионуклидов

2.3.1 Нарботка радионуклидов меди и цинка

Мишени для наработки радионуклидов облучались в НИИ Ядерной физики МГУ. Условия облучения подбирались в соответствии с базой данных сечений ядерных реакций JANIS [171]. Радионуклиды ^{67}Cu и $^{69\text{m}}\text{Zn}$ получали с помощью разрезного микротрона. Пучок электронов энергией $E_e \approx 55$ МэВ бомбардировал вольфрамовый конвектор. Вслед за конвектором находился алюминиевый поглотитель электронов, и непосредственно за ним – мишень. Генерируемые в радиаторе тормозные γ -кванты облучали металлические мишени естественного изотопного состава. Для получения ^{67}Cu была взята цинковая мишень ($\chi(^{64}\text{Zn}) = 48,6\%$, $\chi(^{66}\text{Zn}) = 27,9\%$, $\chi(^{67}\text{Zn}) = 4,1\%$, $\chi(^{68}\text{Zn}) = 18,8\%$, $\chi(^{70}\text{Zn}) = 0,6\%$), для получения $^{69\text{m}}\text{Zn}$ – галлиевая ($\chi(^{69}\text{Ga}) = 60,1\%$, $\chi(^{71}\text{Ga}) = 39,9\%$). Облучение проводилось в течение 2 часов

Радионуклиды ^{61}Cu и ^{64}Cu получали путем облучения никелевой металлической мишени природного изотопного состава ($\chi(^{58}\text{Ni}) = 68,1\%$, $\chi(^{60}\text{Ni}) = 26,2\%$, $\chi(^{61}\text{Ni}) = 1,1\%$, $\chi(^{62}\text{Ni}) = 3,6\%$, $\chi(^{64}\text{Ni}) = 0,9\%$) протонами с энергией $E_p \approx 8$ МэВ, $I = 1$ мкА, время облучения составило 3,5 ч.

Радионуклид ^{65}Zn был получен облучением металлической медной мишени природного изотопного состава ($\chi(^{63}\text{Cu}) = 69,2\%$, $\chi(^{65}\text{Cu}) = 30,8\%$) дейтронами с энергией $E_d = 14,8$ МэВ, $I = 2$ мкА, время облучения составило 6 часов.

Обеспечение работы ускорителей частиц при облучении мишеней обеспечивалось сотрудниками НИИЯФ МГУ.

2.3.2 Выделение радионуклидов меди

Для выделения ^{67}Cu из продуктов облучения цинковой мишени и ^{64}Cu из продуктов облучения никелевой мишени был использован метод хроматографии с помощью сорбента Cu-Resin. Методика выделения из никелевой мишени была описана ранее [172]. Облученные мишени растворяли в концентрированной соляной кислоте, упаривали до влажных солей, доводили водой и HCl до минимального объема и $\text{pH} = 2$, пропускали через колонку, заполненную сорбентом Cu-Resin (TrisKem) (объем сорбента – 2 мл). Цинк и никель смывали 25 мл 0,01М HCl . После смыва цинка и никеля сорбировавшуюся медь смывали 5 М HCl . Разделение меди и цинка контролировали с помощью гамма-спектрометрии по линиям ^{67}Cu 184,6 кэВ и ^{65}Zn 1115 кэВ. Разделение меди и никеля контролировали по линиям в гамма-спектре ^{61}Cu 283 кэВ и одного из продуктов облучения мишени ^{55}Co 477,2 кэВ, отсутствие в продуктах выделения никеля также подтверждалось с помощью спектрофотометрии.

2.3.3 Выделение радионуклидов цинка

Для выделения $^{69\text{m}}\text{Zn}$ из облученной галлиевой мишени (масса мишени – 3–5 г) использован метод экстракции с последующей хроматографией. Облученную галлиевую мишень растворяли в концентрированной HCl с добавлением небольших количеств HNO_3 . Образовавшийся раствор упаривали до влажных солей и переводили в раствор 6М HCl . От избытка галлия в растворе избавлялись четырехкратной экстракцией метилизобутилкетон, насыщенным 6М HCl . После всех стадий экстракции раствор упаривался и остаток перерастворялся в 2М HCl . Из полученного раствора в 2М HCl проводили выделение $^{69\text{m}}\text{Zn}$ на хроматографической колонке, заполненной анионообменной смолой Dowex 1x8 (Cl^- форма), предварительно выдержанной в 2М HCl . После загрузки раствора, дополнительно промывали колонку 2М HCl . После этого цинк смывали с колонки дистиллированной водой. Разделение галлия и цинка контролировали с помощью гамма-спектрометрии по линиям ^{67}Ga 93,3 кэВ и $^{69\text{m}}\text{Zn}$ 438,6 кэВ.

Радионуклид ^{65}Zn выделяли из облученной медной мишени (масса мишени – 1.5 грамма) через 2 дня после облучения. Медную мишень растворяли в 65% азотной кислоте, после чего раствор упаривали и перерастворяли в 2М HCl .

Полученный раствор пропускали через колонку, заполненную сорбентом Dowex 1x8, предварительно выдержанном в 2М HCl. После загрузки раствора колонку промывали 2М HCl, затем после вымывания меди цинк смывали дистиллированной водой. Фракции, содержащие целевой радионуклид, упаривали и перерастворяли в HCl с pH 2.

2.4 Изучение термодинамической устойчивости комплексов

2.4.1 Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование проводилось с помощью автитратора Titrino Plus 848, образцы термостатировались в ходе титрования при температуре $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Эксперименты проводились в стеклянной ячейке в растворе объемом 20 мл. Значение потенциала электрода измерялось после добавления порций по 0,03 мл стандартного раствора, равновесие считали установленным, если изменение потенциала составляло $\Delta E < 0,2$ мВ/мин.

Приготовленный раствор NaOH ($c(\text{NaOH}) \approx 0,1\text{M}$) стандартизовали с помощью титрования стандартного раствора $0,1\text{M}$ $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Титрование проводили до получения трех сходящихся значений.

Для калибровки электрода было проведено титрование $0,1\text{M}$ HClO_4 . Из данных титрования была получена зависимость потенциала раствора от концентрации добавленной щелочи. С помощью программы GLEE (glass electrode evaluation), которая основана на методе участков Граана, производилась линейная аппроксимация полученной зависимости и было найдено значение E° , используемое в дальнейших расчетах.

Константы протонирования лиганда определялись путем потенциометрического кислотно-основного титрования $0,001\text{M}$ раствора лиганда в присутствии $0,005\text{M}$ HClO_4 .

Константа комплексообразования определялась аналогичным образом. Концентрация ионов металла и лиганда составляла $0,001\text{M}$. При расчётах учитывались определённые ранее константы протонирования лиганда и константы гидролиза катиона.

При каждом титровании в раствор добавлялся KNO_3 до концентрации 0,1М для поддержания постоянной ионной силы в течение всего эксперимента. Через раствор пропускали N_2 для вытеснения углекислого газа.

2.4.2 Расчет константы протонирования лиганда и констант устойчивости комплексов

По результатам потенциометрического титрования расчет константы протонирования лиганда и константы устойчивости комплекса производились с помощью программы HyperQuad. Программа с помощью математических расчетов моделирует кривую титрования. Для этого используются константы гидролиза катионов и ионное произведение воды (данные о константах гидролиза катионов взяты из базы данных HYDRA [173], а также значение E° , полученное при калибровке электрода. Для расчета констант устойчивости комплексов необходимо в первую очередь рассчитать константы протонирования лиганда.

Расчет констант устойчивости комплекса по результатам экстракционных экспериментов проводился исходя из полученных значений констант протонирования лиганда и уравнения материального баланса.

2.4.3 Жидкость-жидкостная экстракция катионов Bi^{3+}

Данный метод основан на извлечении гидратированного катиона металла из раствора с помощью экстрагента, комплекс с исследуемым лигандом при этом остается в изначальном водном растворе.

В качестве экстрагента был взят 0,01 М раствор ди-(2-этилгексил)фосфорной кислоты в толуоле, уравновешенный с раствором 0,1М NaClO_4 при pH 3. Экстракцию проводили из растворов комплекса в 0,1М NaClO_4 при pH 3 с варьируемым содержанием лиганда. После интенсивного перемешивания в течение 15 минут разделение водной и органической фазы проводили с помощью центрифугирования при 5000 g в течение 5 минут.

2.4.4 Осаждение нерастворимых соединений Bi^{3+}

Так как при комплексообразовании количество осажденного нерастворимого гидроксида уменьшается, то, при известном значении ПР и pH возможно вычислить константу устойчивости для комплекса.

Растворы, содержащие $\text{Bi}(\text{ClO}_4)_3$, меченный ^{207}Bi (концентрация $1 \cdot 10^{-6}$ М), лиганд L1 (концентрации от $1 \cdot 10^{-7}$ М до $1 \cdot 10^{-4}$ М), 0,1М NaClO_4 для поддержания фиксированного значения ионной силы, доведенные до pH 6.0 выдерживались в течение суток. Затем растворы центрифугировались при 31000 g в течение часа, после чего отбирался маточный раствор. Радиоактивность маточного раствора измерялась с помощью жидкостно-сцинтилляционной спектрометрии.

2.5 Определение степени связывания радионуклидов от концентрации лигандов

Степень связывания радиоактивной метки определялась с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). Оптимальные условия для ТСХ подбирались в элюентах, содержащих NH_4Cl и CH_3ONH_4 , MeOH , CHCl_3 , CH_3CN , CF_3COOH , 0,9% NaCl и NaOH . Для проведения тонкослойной хроматографии использовались алюминиевые пластины с нанесенным сорбентом из силикагеля или целлюлозы (Sigma Aldich) и бумага с силикагельными волокнами i-TLC (Agilent Technologies).

При подборе условий анализировались R_f , вычисляемый по формуле

$$R_f = \frac{z}{l}$$

, где z – расстояние от старта до центра пятна, l – длина пробега элюента, и R_s , вычисляемый по формуле

$$R_s = \frac{z_1 - z_2}{0,5 \cdot (w_1 - w_2)}$$

где z_1 и z_2 – расстояния от старта до центров пятен, а w_1 и w_2 – ширины пятен.

Для проведения количественного измерения степени связывания метки пластины после проведения ТСХ разделялись на 2 части в соответствии со значениями R_f , после чего измерялась активность частей пластин с помощью гамма-спектрометрии. Степень мечения рассчитывалась по формуле:

$$\text{CM} = \frac{A_{\text{компл.}}}{A_{\text{общ.}}}$$

, где $A_{\text{компл.}}$ – активность части пластины, соответствующей комплексному соединению, $A_{\text{общ.}}$ – суммарная активность обеих частей пластины.

2.6 Изучение устойчивости комплексов в сыворотке крови

С целью соблюдения принципов гуманного обращения с лабораторными животными и минимизации количества животных, используемых в эксперименте (принципы 3R [174]) перед экспериментами *in vivo* проводились эксперименты по устойчивости в сыворотке крови *in vitro*. Схожая методика изучения устойчивости меченных соединений в сыворотке крови описана ранее Торресом и соавторами [175], условия центрифугирования (скорость вращения ротора) для полного осаждения сывороточных белков были отдельно подтверждены в серии «холостых» экспериментов.

100 мкл растворов комплексов с концентрацией лигандов $5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$ М смешивали с эмбриональной телячьей сывороткой (Fetal bovine serum, FBS, HyClone) в объёмном соотношении $V(\text{p-ра ML}):V(\text{FBS})=1:9$, данную смесь инкубировали при 37°C. Аликвоты в 100 мкл отбирали через 1, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 минут и 1 сутки, смешивали с 300 мкл 96%-ного этанола и охлаждали до 2–4°C для осаждения белков, после чего осадок отделяли с помощью центрифугирования при 4000 g в течение 5 минут и декантирования 300 мкл маточного раствора. Активность полученного маточного раствора измеряли с помощью гамма-спектрометрии или жидкостно-сцинтилляционной спектрометрии. В качестве образца сравнения отбирали 75 мкл исходного образца, разбавленного 225 мкл сыворотки. Холостые эксперименты проводились аналогичным образом с растворами радиоактивной метки, не содержащей лигандов.

2.7 Проведение экспериментов *in vivo*

Распределение препарата изучалось на организме самцов конвенциональных аутбредных лабораторных мышей (сток CD-1). Мыши содержались в условиях 12-часового суточного цикла с доступом к корму и воде *ad libitum*. Для каждой точки было использовано по 3 мыши.

Исследуемые вещества растворялись в 0.9% растворе NaCl и доводились до pH 6.5–7.0 с помощью ацетатного буфера. Перед введением для каждого образца контролировалась степень связывания метки лигандом с помощью ТСХ, которая

составляла не менее 95%. Меченые комплексы $[^{207}\text{Bi}]\text{BiL3}$ и $[^{207}\text{Bi}]\text{BiEDTA}$ вводились внутривенно (в хвостовую вену), комплексы $[^{207}\text{Bi}]\text{BiL2}$, $[^{65}\text{Zn}]\text{ZnL2}$, $[^{65}\text{Zn}]\text{ZnL3}$, а также хлорид цинка внутривенно. Объем внутривенного введения составлял 200 мкл, внутривенного – 100 мкл. Мышь подвергалась эвтаназии с помощью цервикальной дислокации и декапитации (как дублирующего метода эвтаназии) через 1 или 6 часов после введения. Органы (печень, почки, селезенка, легкие, сердце, поджелудочная железа, мозг, бедренная кость) отделялись постмортально, промывались в физиологическом растворе и взвешивались, накопленная в органах радиоактивность измерялась с помощью гамма-спектрометрии. Кровь собиралась после декапитации и смешивалась с 100 мкл раствора гепарина. Общее количество крови, циркулирующей в организме, рассчитывалось по формуле:

$$V_{\text{кр}} = 0,06 \cdot m + 0,77$$

, где m – масса мыши [176].

Моча собиралась после вскрытия из мочевого пузыря с помощью шприца.

Процент от введенной дозы на грамм органа рассчитывался по формуле:

$$\% \frac{ID}{g} = \frac{A}{A_{\text{введ}} \cdot m_{\text{орг}}} \cdot k_{\text{об}} \cdot 100$$

, где A – измеренная активность, накопленная в органе, $A_{\text{введ}}$ – суммарная активность введенного препарата, $m_{\text{орг}}$ – масса органа, $k_{\text{об}}$ – калибровочный коэффициент, учитывающий объем измеряемого образца.

Операционные процедуры проводились в соответствии с руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [177] и директивой Европейской комиссии 2010/63/EU.

Глава 3. Выделение радионуклидов меди и цинка из облученных металлических мишеней

Для проведения экспериментов по определению условий мечения лигандов, а также устойчивости комплексов меди и цинка в условиях *in vitro* и *in vivo* проводилось выделение радионуклидов ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{65}Zn и $^{69\text{m}}\text{Zn}$ из продуктов облучения металлических мишеней. В данной главе приведены основные результаты выделения целевых радионуклидов.

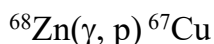
При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

- 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
- 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, 321(1):125–132, 2019.
- Р. А. Алиев, Г. Ю. Алешин, С. С. Бельшев, Б. С. Ишханов, А. Б. Приселкова, В. В. Ханкин, В. Ю. Пожарская, М. А. Орлова, С. Н. Калмыков. Фотоядерное получение радионуклидов без носителя: $\text{Zn-}^{69\text{m}}$. / Известия Академии наук. Серия химическая, (2):368–372, 2017

3.1 Хроматографическое выделение ^{67}Cu и ^{64}Cu

3.1.1 Выделение ^{67}Cu

В гамма-спектре облученной цинковой мишени (рис. 25) наблюдались линии целевого ^{67}Cu , а также $^{69\text{m}}\text{Zn}$, линия с энергией 511 кэВ, связанная с наличием ^{64}Cu и ^{65}Zn , распадающихся по β^+ -распаду. Ядерная реакция, приводящая к целевому радионуклиду, описывается следующим образом:



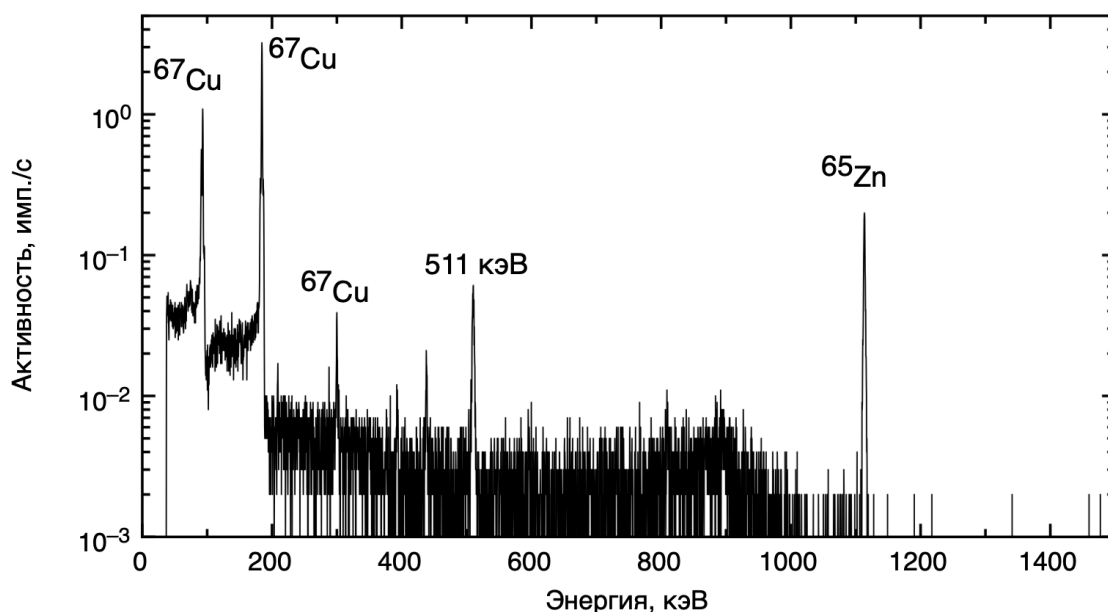


Рисунок 25. Гамма-спектр облученной цинковой мишени через 12 часов после облучения

Разделение цинка и меди контролировали по линиям 184.6 кэВ для ^{67}Cu и 1115 кэВ для ^{65}Zn . На рис. 26 приведена хроматограмма выделения целевого радионуклида. Элюирование цинка с колонки проводили раствором 0,01М HCl (pH = 2). Объем пропущенного раствора 0,01М HCl составил 25 мл. После этого Cu^{2+} смывали 5 М HCl. На рисунке видно, что в области разбавленной кислоты наблюдается небольшой пик ^{67}Cu , который, вероятнее всего, связан с наличием Cu^+ , образовавшегося из-за восстановительных процессов при растворении металлической мишени в кислоте. Выход хроматографического выделения ^{67}Cu составил 93%. Суммарная выделенная активность составила 23,4 кБк.

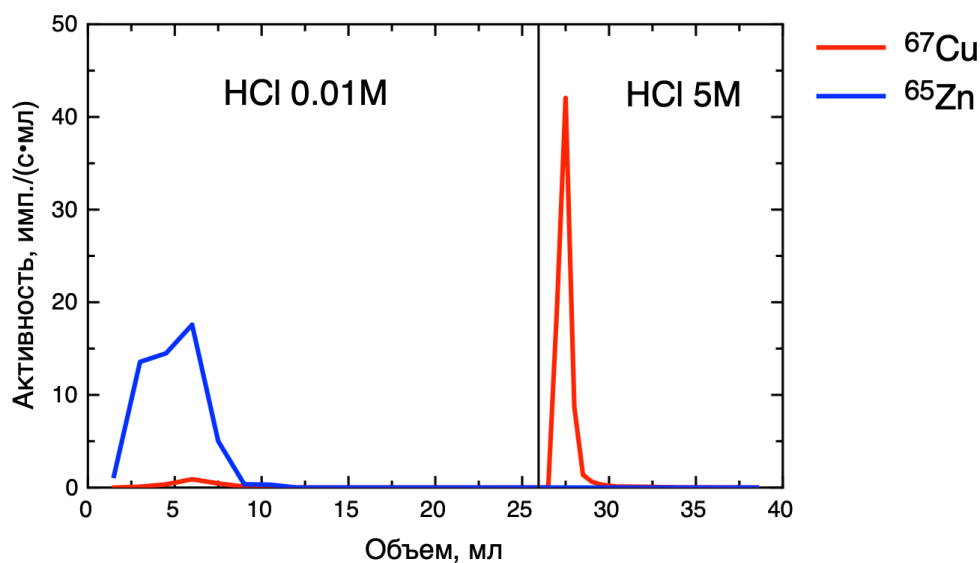


Рисунок 26. Хроматограмма разделения меди и цинка на сорбенте Cu-Resin.

3.1.2 Выделение ^{64}Cu

В гамма-спектре облученной никелевой мишени через 3 часа после облучения (рис. 27) наблюдались пики, характерные для ^{61}Cu , ^{64}Cu , ^{55}Co и ^{58}Co . Целевые радионуклиды получались по реакциям:

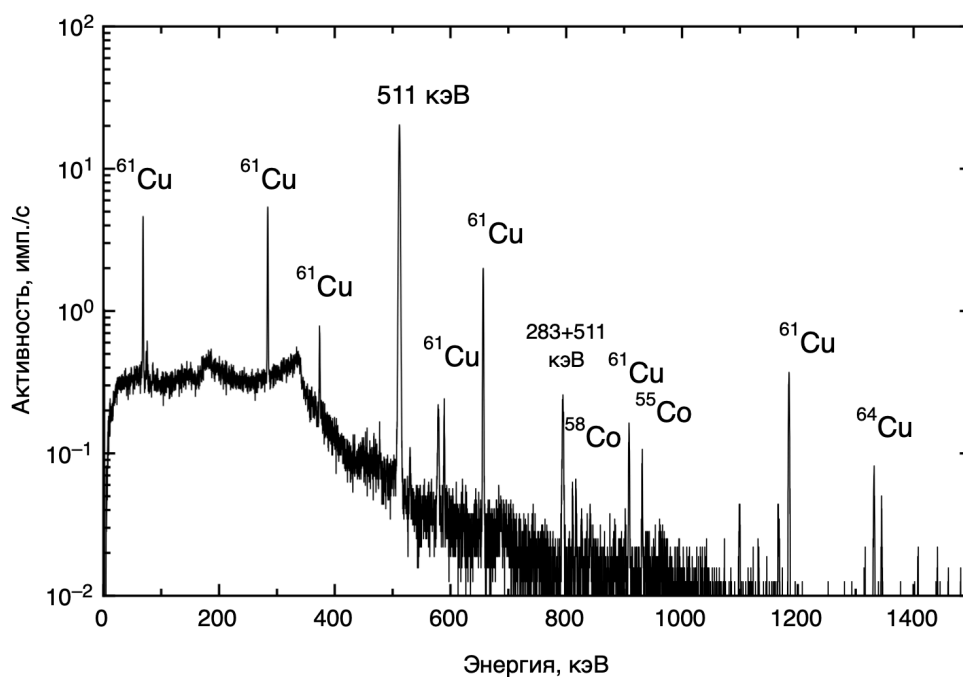
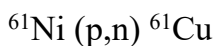
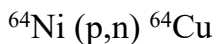


Рисунок 27. Гамма-спектр аликвоты (2 мкл) продуктов растворения облученной никелевой мишени в HCl .

Выделение радионуклидов ^{61}Cu и ^{64}Cu проходило в аналогичных условиях (хроматограмма приведена на рис. 28). Контроль выхода никеля осуществлялся по радионуклидам кобальта ^{55}Co и ^{58}Co , образующихся по реакциям $^{58}\text{Ni} (p,\alpha) ^{55}\text{Co}$ и $^{61}\text{Ni} (p,\alpha) ^{58}\text{Co}$ в связи со схожестью их физико-химических свойств, в том числе поведения на анионообменных сорбентах [178], дополнительно выход никеля контролировался спектрофотометрически. Суммарная выделенная радиоактивность составила 1,1 МБк по ^{64}Cu , выход хроматографического выделения – 95%.

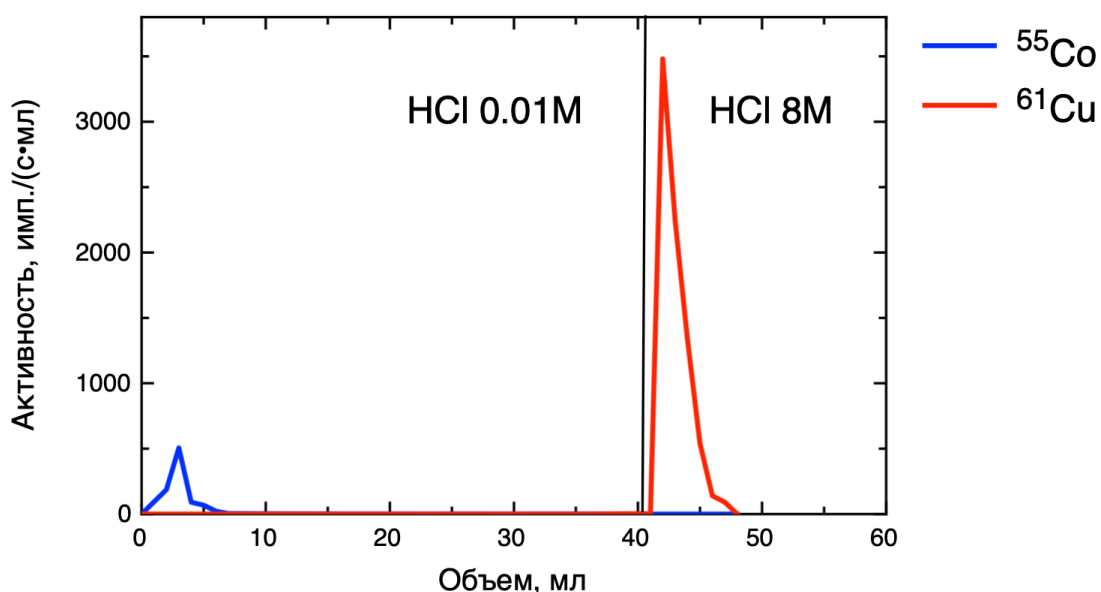


Рисунок 28. Хроматограмма выделения радионуклидов меди из продуктов облучения никелевой мишени на сорбенте Dowex 1×8

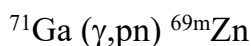
Как видно, циклотронный способ получения радионуклидов меди дает существенно бóльшие уровни радиоактивности целевых радионуклидов для решения задач, поставленных в рамках данной работы. В то же время, для проведения фундаментальных исследований более удобными являются радионуклиды с большим периодом полураспада. Однако, получение радиохимически чистого ^{67}Cu с периодом полураспада 61,83 часа с достаточными активностями требует использования мишеней, обогащенных по изотопу ^{68}Zn [179], что не представляется целесообразным в рамках изучения физических и химических свойств меченных соединений.

3.2 Хроматографическое выделение $^{69\text{m}}\text{Zn}$ и ^{65}Zn

3.2.1 Выделение $^{69\text{m}}\text{Zn}$

В гамма-спектре облученной галлиевой мишени (рис. 29) наблюдались пики целевого радионуклида $^{69\text{m}}\text{Zn}$, а также ^{67}Ga , ^{66}Ga и $^{71\text{m}}\text{Zn}$.

Реакция, приводящая к целевому радионуклиду, описывается следующим образом:



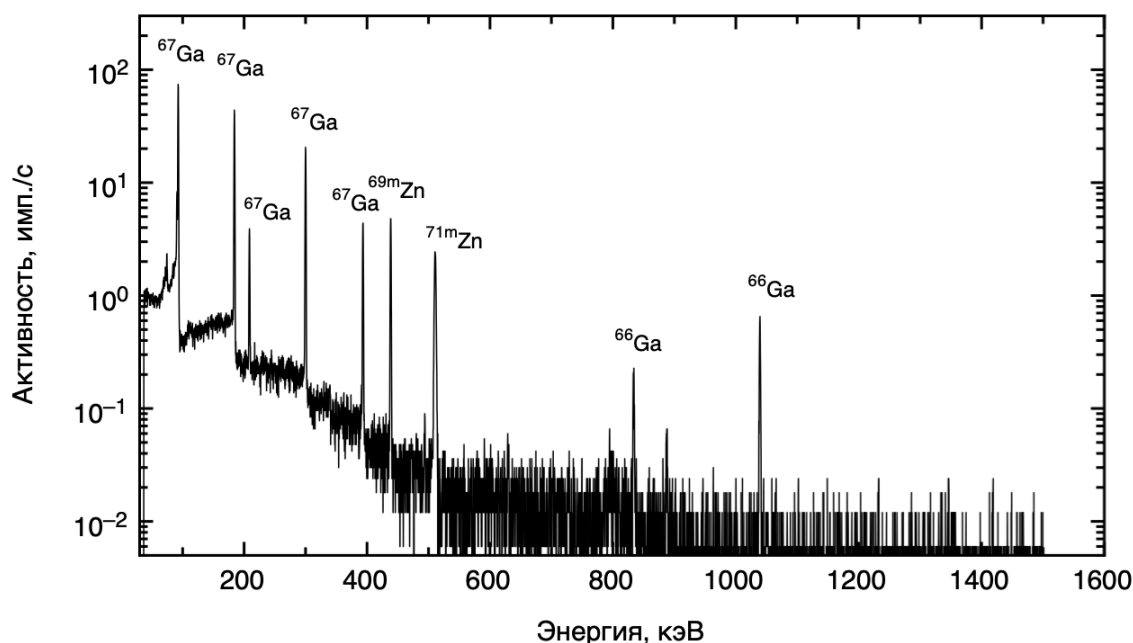


Рисунок 29. Гамма-спектр аликвоты раствора облученной галлиевой мишени после растворения в HCl через 12 часов после облучения.

Условия для хроматографии подбирались согласно литературным данным [178] в соответствии с зависимостями коэффициентов распределения ($D = \frac{[Me^{n+}]_{\text{сорб.}}}{[Me^{n+}]_{\text{водн.}}}$) катионов в анионообменных смолах в зависимости от концентрации кислоты (рис. 30): максимальные значения $\lg D$ для цинка достигаются при концентрациях $c(\text{HCl}) = 2\text{M}$, в то время как связывание галлия сорбентом минимально при той же концентрации кислоты.

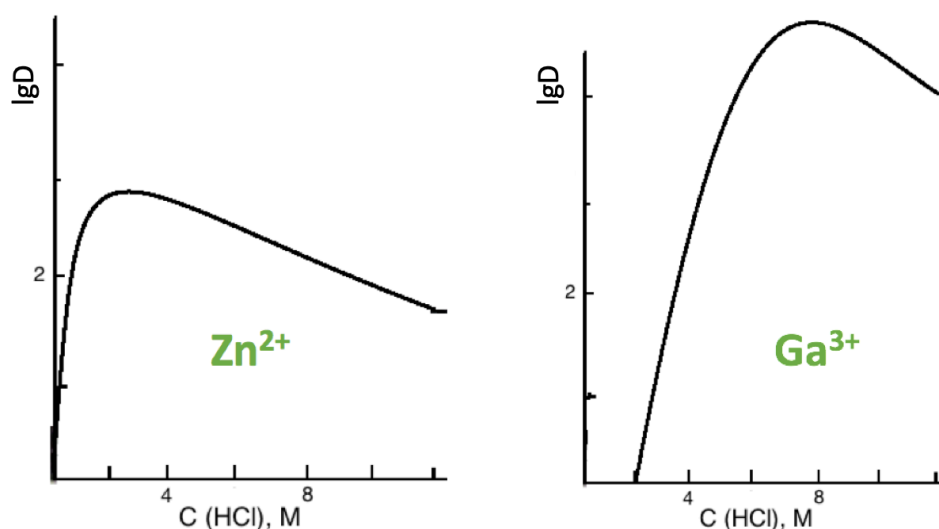


Рисунок 30. Зависимость логарифма коэффициента распределения для катионов цинка (слева) и галлия (справа) от концентрации соляной кислоты [178].

Несмотря на малые значения lgD для Ga^{3+} при $c(HCl) = 2M$, в связи с присутствием макроколичеств галлия (масса металлической мишени составляла около 4 граммов) и, в то же время, крайне незначительных химических количеств Zn^{2+} в растворе, для проведения эффективного хроматографического разделения необходимо было предварительно отделить макроколичества галлия из солянокислого раствора. Данная стадия необходима в связи с ограниченной емкостью сорбента: при отсутствии этой стадии на первом отрезке хроматографии вместе с галлием выходит также большая часть образовавшегося ^{69m}Zn .

Галлий экстрагируется метилизобутилкетонем в среде 6M HCl в виде неполярного анионного комплекса $[GaCl_4]^-$, цинк в этих условиях не экстрагируется. Контроль процесса экстракции проводился путем отбора аликвот растворов после экстракции и измерения радиоактивности ^{67}Ga (побочный продукт, образовавшийся по реакции $^{68}Ga(\gamma, n)^{67}Ga$) и ^{69m}Zn в них. При удалении макроколичеств галлия жидкость-жидкостной экстракцией метилизобутилкетонем (МИБК) через 4 стадии экстракции удаляется около 78% ^{67}Ga , в то время как ^{69m}Zn полностью остается в водной фазе.

Хроматограмма разделения ^{69m}Zn и ^{67}Ga приведена на рис. 31. В результате разделения получен радиохимически чистый ^{69m}Zn без примесей других радионуклидов. Количественный выход составил 92%, общая выделенная активность составила 1 кБк.

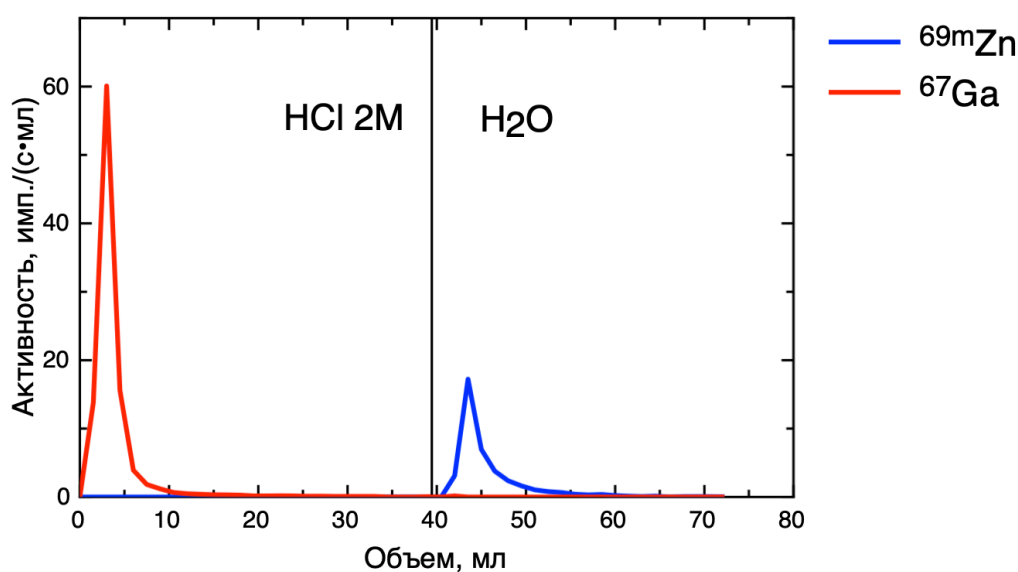
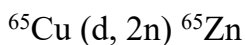


Рисунок 31. Хроматограмма разделения ^{69m}Zn и ^{67}Ga на сорбенте Dowex 1×8

3.2.2 Выделение ^{65}Zn

Радионуклид ^{65}Zn ($T_{1/2} = 244,26$ дней) был получен из медной мишени природного изотопного состава по реакции:



В гамма-спектре продуктов облучения через 2 дня были обнаружены только линии, соответствующие ^{65}Zn и ^{64}Cu (гамма спектр представлен на рис. 32)

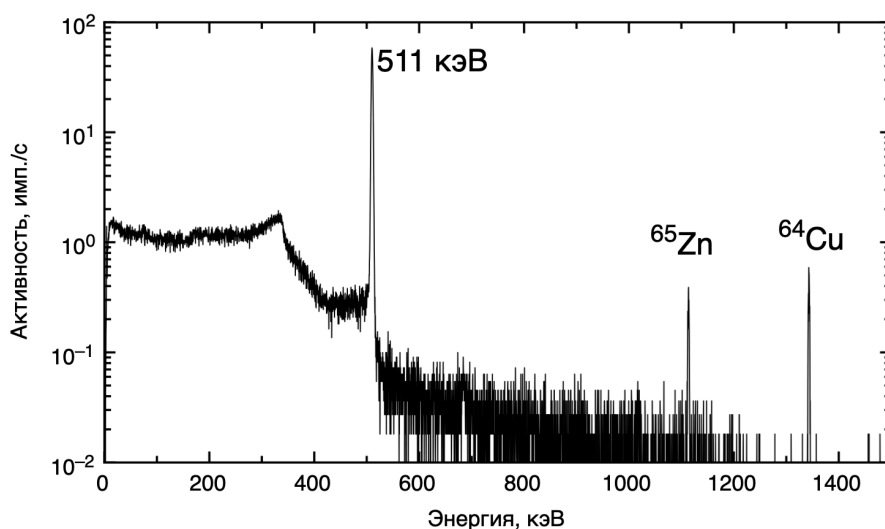


Рисунок 32. Гамма-спектр аликвоты продуктов растворения облученной медной мишени через 2 дня после облучения

Разделение цинка и меди происходило на анионообменной смоле Dowex 1x8, предварительно насыщенной 2М HCl. Контроль разделения осуществлялся по линиям, соответствующим ^{64}Cu (1346 кэВ) и ^{65}Zn (1115 кэВ). В среде 2М HCl цинк в виде хлоридного анионного комплекса ($\lg\beta(\text{ZnCl}_4^{2-}) = 0,2$) сорбирован на колонке, а катионы меди в этих условиях ещё не образуют хлоридные комплексы ввиду значительно меньшей константы ($\lg\beta(\text{CuCl}_4^{2-}) = -3,6$). После снижения активности по пику 1346 кэВ (^{64}Cu) до нулевой продолжали промывание колонки 2М HCl (15 мл), после чего ^{65}Zn элюировали дистиллированной водой.

Выход побочных продуктов контролировался по линиям ^{64}Cu 1345,8 кэВ и 511 кэВ, так как поведение кобальта и никеля по отношению к анионообменным смолам идентично. Суммарная активность выделенного ^{65}Zn составила 420 кБк, выход хроматографического выделения – 95%. Хроматограмма выделения ^{65}Zn представлена на рис. 33.

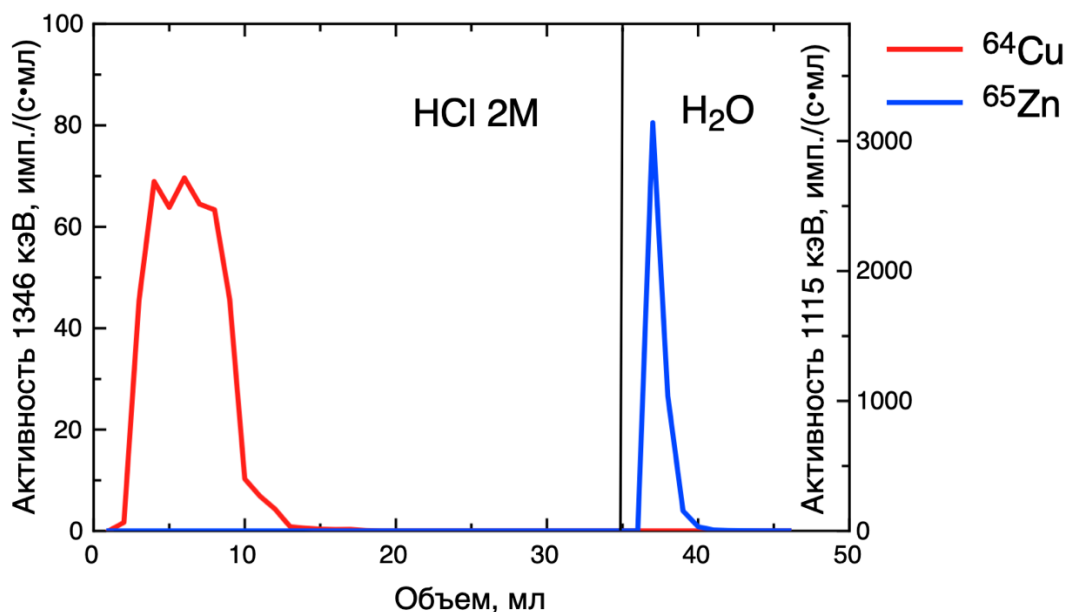


Рисунок 33. Хроматограмма выделения ^{65}Zn из облученной медной мишени на сорбенте Dowex 1×8

Несмотря на отсутствие перспектив медицинского использования непосредственно изотопа ^{65}Zn , большой периода полураспада позволяет работать с ним гораздо дольше после облучения мишени, чем при получении потенциально применимых в ядерной медицине радионуклидов ^{62}Zn и ^{63}Zn . В связи с этим его использование при проведении поисковых исследований комплексов для получения радиофармпрепаратов имеет большой потенциал. В дальнейших исследованиях комплексов цинка в рамках данной работы использовался ^{65}Zn , полученный описанным выше образом.

Глава 4. Определение констант устойчивости комплексов

Как было отмечено выше, первой стадией изучения комплекса, рассматриваемого как потенциальный компонент радиофармпрепарата, является исследование его термодинамической устойчивости в модельных условиях. При этом для лигандов, которые были синтезированы впервые и, соответственно, не изучались ранее, необходимо определить характеристические свойства, влияющие на комплексообразующую способность, в первую очередь, рассчитать константы протонирования. В данной главе обсуждаются результаты расчетов констант протонирования лигандов L1 и L2, а также констант устойчивости комплексов лигандов L1, L2 и L3 с Cu^{2+} , Zn^{2+} и Bi^{3+} .

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

- 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

4.1 Определение констант протонирования лигандов

Для лигандов L1 и L2 значения констант протонирования определялись впервые в рамках данной работы. Для этого к растворам лигандов добавляли раствор HClO_4 и затем титровали раствором щелочи, измеряя потенциал индикаторного электрода. Графики распределений протонированных и непротонированной форм L1 и L2 в растворе в зависимости от pH представлены на рис. 34 и 35 соответственно, экспериментальные и расчетные кривые титрования приведены в приложении. В исследованном диапазоне pH в водном растворе L1 способен высвободить 2 протона от 2 протонированных аминогрупп, L2 – 4 протона от 3 протонированных амино- и карбоксильных групп. Значения рассчитанных констант протонирования и образующиеся составы представлены в табл. 4 (L1) и 5 (L2).

Таблица 4. Константы протонирования лиганда L1 в воде ($\mu=0.1\text{M}$) при 25°C .

L1	H⁺	Уравнения констант протонирования	$\lg\beta$	Равновесие
1	1	$\beta_{\text{LH}}=[\text{L1}\cdot\text{H}^+]/[\text{L1}]\cdot[\text{H}^+]$	$9,4 \pm 0,1$	$\text{L1}+\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L1}\cdot\text{H}^+$
1	2	$\beta_{\text{LH2}}=[(\text{L1})\cdot(\text{H}^+)_2]/[(\text{L1})]\cdot[\text{H}^+]^2$	$17,5 \pm 0,1$	$(\text{L1})+2\text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{L1})\cdot(\text{H}^+)_2$

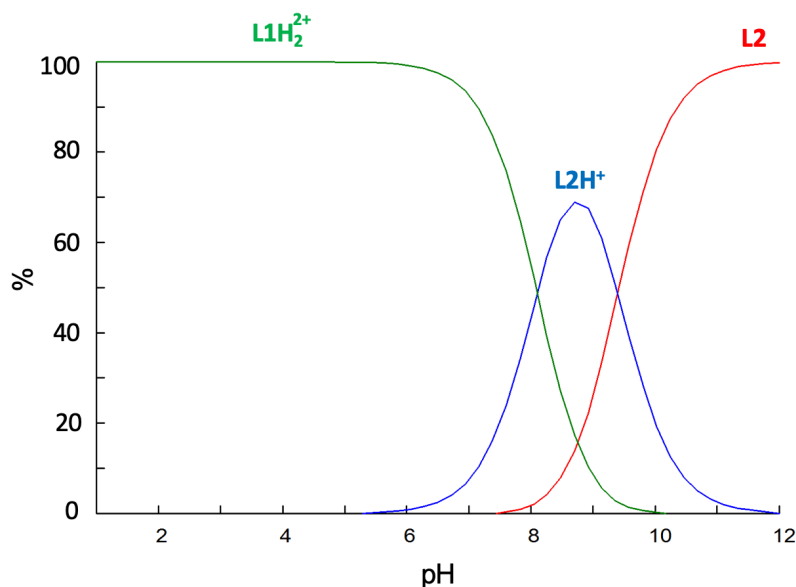


Рисунок 34. Распределение протонированных и непротонированной форм лиганда L1 в растворе в зависимости от pH (справа) ($c(\text{L1}) = 1 \cdot 10^{-3}\text{M}$)

Таблица 5. Константы протонирования лиганда L2 в воде ($\mu=0.1\text{M}$) при 25°C .

L2	H⁺	<i>W0</i>	$\lg\beta$	Равновесие
1	1	$\beta_{\text{LH}}=[\text{L2}\cdot\text{H}^+]/[\text{L2}]\cdot[\text{H}^+]$	$9,9\pm0,1$	$\text{L2}+\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L2}\cdot\text{H}^+$
1	2	$\beta_{\text{LH2}}=[(\text{L2})\cdot(\text{H}^+)_2]/[(\text{L2})]\cdot[\text{H}^+]^2$	$17,7\pm0,1$	$(\text{L2})+2\text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{L2})\cdot(\text{H}^+)_2$
1	3	$\beta_{\text{LH3}}=[(\text{L2})\cdot(\text{H}^+)_3]/[(\text{L2})]\cdot[\text{H}^+]^3$	$21,2\pm0,1$	$(\text{L2})+3\text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{L2})\cdot(\text{H}^+)_3$
1	4	$\beta_{\text{LH4}}=[(\text{L2})\cdot(\text{H}^+)_4]/[(\text{L2})]\cdot[\text{H}^+]^4$	$23,8\pm0,2$	$(\text{L2})+4\text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{L2})\cdot(\text{H}^+)_4$

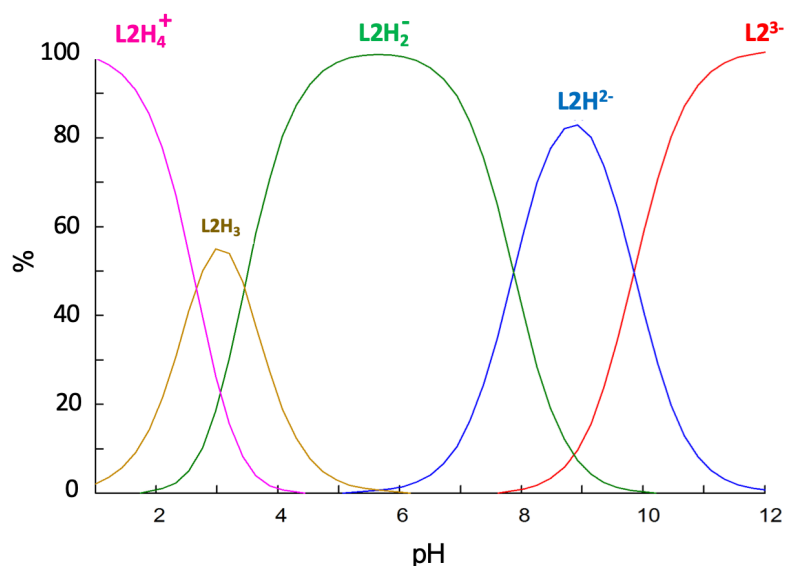


Рисунок 35 . Распределение протонированных и непротонированной форм лиганда L2 в растворе в зависимости от рН (справа) ($c(L1) = 1 \cdot 10^{-3} M$)

В исследуемых лигандах несколько типов электрон-донорных атомов: азот и кислород в макроциклах, а также кислород в карбоксильных группах для L2.

Анализируя значения констант можно заметить, что в обоих случаях логарифмы первых констант протонирования находятся в диапазоне 9,2–9,3. Эти значения соответствуют протонированию аминогрупп в аминах и аминокислотах, например, метиламине ($\lg K(LH) = 10,63$) и глицине ($\lg K(LH) = 9,56$) [180]. Наиболее близкое значение среди аминокислот у фенилаланина ($\lg K(LH) = 9,09$) [180], что можно объяснить влиянием бензольного кольца как акцептора электронов и, как следствие, незначительного усиления кислотных свойств. Протонирование L1 по второй ступени происходит с несколько меньшим значением ступенчатой константы $\lg K$ вследствие незначительного влияния электростатического отталкивания протона и уже положительно заряженного LH^+ . В связи с чем более вероятно, что протонирование L1 по второй ступени осуществляется по второй крайней аминогруппе. Таким образом, можно предположить, что образование трижды протонированной формы L1, т.е. присоединение третьего протона к двухзарядному иону LH_2^{2+} по средней аминогруппе, возможно только в большом избытке протонов, то есть в значительно более кислотных средах, чем рассмотренные нами условия. Последнее подтверждается значительно меньшим $\lg K(LH_3) = 3,5$, наблюдаемое для L2. При этом протонирование L2 по первым двум ступеням аналогично L1. В случае L2 возможность образования цвиттер-ионов аналогично аминокислотам позволяет наблюдать три- и тетрапротонированную формы. Логарифм константы

протонирования по четвертой ступени составляет 2,6, что согласуется с протонированием карбоксильной группы в аминокислотах (глицин, $\lg K(\text{COOH})=2,36$). По сравнению с такими классическими макроциклическими лигандами, как DOTA ($\lg K(\text{LH}) = 10,19$) и TETA ($\lg K(\text{LH}) = 10,68$), а также некоторыми ациклическими лигандами, такими как EDTA ($\lg K(\text{LH}) = 11,22$) и DTPA ($\lg K(\text{LH}) = 10,48$) [180] константы протонирования L1 и L2 несколько меньше. Большую легкость депротонирования можно объяснить лучшей стерической доступностью протонированных атомов азота из-за более жесткого каркаса молекулы лиганда, обусловленного наличием бензольного кольца. Это связано с тем, что третичные амины, как правило, не являются более основными, чем вторичные. Так, например, основность этиламина ($\lg K(\text{LH}) = 10,64$) несколько ниже, чем у диэтиламина ($\lg K(\text{LH}) = 10,93$); в то же время ожидаемого усиления основных свойств от диэтиламина к триэтилмину ($\lg K(\text{LH}) = 10,71$) не происходит из-за усиливающегося влияния пространственных затруднений [180].

Для лиганда L3 константы протонирования были определены ранее [181]. Значения констант протонирования L3 приведены в табл. 6. Протонирование по первой ступени аналогично триацетатному L2, но по второй и третьей ступени константы на порядок ниже. Бóльший размер макроцикла L3 и жёсткость пиридин-диамидного фрагмента, раскрывающая макроцикл [181], уменьшают стерические затруднения как для реакции протонирования, так и для депротонирования. В случае L3 согласно рентгеноструктурному анализу две из трёх карбоксильных групп существуют в депротонированном виде, что соответствует выводам для аналогичного трикарбоксилатного L2.

Таблица 6. Константы протонирования лиганда L3 в воде ($\mu=0.1\text{M}$) при 25°C [181].

L3	H⁺	<i>Уравнения констант устойчивости</i>	<i>lgβ</i>	Равновесие
1	1	$\beta_{\text{LH}}=[\text{L3} \cdot \text{H}^+]/[\text{L3}] \cdot [\text{H}^+]$	9,9 ± 0,1	$\text{L3} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L3} \cdot \text{H}^+$
1	2	$\beta_{\text{LH2}}=[(\text{L3}) \cdot (\text{H}^+)_2]/[(\text{L3})] \cdot [\text{H}^+]$	16,7 ± 0,2	$(\text{L3}) + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{L3}) \cdot (\text{H}^+)_2$
1	3	$\beta_{\text{LH3}}=[(\text{L3}) \cdot (\text{H}^+)_3]/[(\text{L3})] \cdot [\text{H}^+]$	19,5 ± 0,2	$(\text{L3}) + 3\text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{L3}) \cdot (\text{H}^+)_3$
1	4	$\beta_{\text{LH4}}=[(\text{L3}) \cdot (\text{H}^+)_4]/[(\text{L3})] \cdot [\text{H}^+]$	22,4 ± 0,2	$(\text{L3}) + 4\text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{L3}) \cdot (\text{H}^+)_4$

4.2 Определение констант устойчивости комплексов

Комплексообразование лигандов L1 и L2 с катионами меди (II) и цинка (II) изучали в интервале значений pH 2-12. При расчете учитывали образование протонированных (для CuL2 и ZnL2) и гидроксидных форм (для CuL1, ZnL1 и ZnL2), а также полученные ранее константы протонирования лигандов, константы гидролиза катионов [173] и диссоциацию воды.

Рассчитанные константы устойчивости для комплексов Cu²⁺ и Zn²⁺ с L1 и L2 приведены в табл. 7, формы комплексов в растворе – на рис. 36–39. Литературные данные об устойчивости гидроксокомплексов ионов Cu²⁺ и Zn²⁺, а также кривые титрования приведены в приложениях.

Введение трех карбоксильных групп в состав лиганда увеличивает устойчивость образующихся комплексов. Вместе с тем при внедрении в структуру кислотных групп закономерно уменьшается роль гидроксокомплексов в системе в связи с увеличением дентатности лиганда и, как следствие, возможностью координировать катион металла с образованием большего количества связей.

Полученные значения $lg\beta_{ML}$ закономерно меньше аналогичных констант для комплексов с DOTA ($lg\beta_{CuDOTA} = 22,21$, $lg\beta_{ZnDOTA} = 21,05$ [180]) и сопоставимы с константами для комплексов с ациклическими лигандами или, в некоторых случаях, даже меньше их: например, для DTPA $lg\beta_{CuDTPA} = 21,0$, $lg\beta_{ZnDTPA} = 18,8$ [182]. 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. С другой стороны, большие константы комплексообразования для DOTA по сравнению с L1 и L2 можно связать с влиянием четвертой карбоксильной группы на процесс хелатирования катиона металла. Например, комплексы цинка с EDDA, содержащим две карбоксильные группы ($lg\beta_{ML} = 11,1$ [180]) приблизительно на 5 порядков менее устойчивы, чем аналогичные комплексы с EDTA, в котором находится четыре карбоксильные группы ($lg\beta_{ML} = 16,5$ [180]), несмотря на то, что для Zn²⁺ с характерным КЧ = 4 дентатности обоих лигандов достаточно для координационного насыщения катиона.

Таблица 7. Константы устойчивости комплексов Cu^{2+} и Zn^{2+} с L1 и L2 (отрицательный коэффициент у H^+ означает наличие OH^- -групп)

	L	Me^{2+}	H^+	Состав комплекса	$\lg\beta$
CuL1	1	1	0	$[\text{Cu}(\text{L1})]^{2+}$	$15,6 \pm 0,1$
	1	1	-1	$[\text{Cu}(\text{L1})(\text{OH}^-)]^+$	$9,2 \pm 0,1$
	1	1	-2	$[\text{Cu}(\text{L1})(\text{OH}^-)_2]$	$-0,8 \pm 0,1$
CuL2	1	1	0	$[\text{Cu}(\text{L2})]^-$	$16,8 \pm 0,1$
	1	1	1	$[\text{Cu}(\text{L2})(\text{H}^+)]$	$20,5 \pm 0,1$
ZnL1	1	1	0	$[\text{Zn}(\text{L1})]^{2+}$	$8,8 \pm 0,1$
	1	1	-1	$[\text{Zn}(\text{L1})(\text{OH}^-)]^+$	$0,7 \pm 0,2$
	1	1	-2	$[\text{Zn}(\text{L1})(\text{OH}^-)_2]$	$-9,8 \pm 0,2$
ZnL2	1	1	0	$[\text{Zn}(\text{L2})]^-$	$14,9 \pm 0,1$
	1	1	1	$[\text{Zn}(\text{L2})(\text{H}^+)]$	$19,0 \pm 0,1$
	1	1	-1	$[\text{Zn}(\text{L2})(\text{OH}^-)]^{2-}$	$3,6 \pm 0,1$

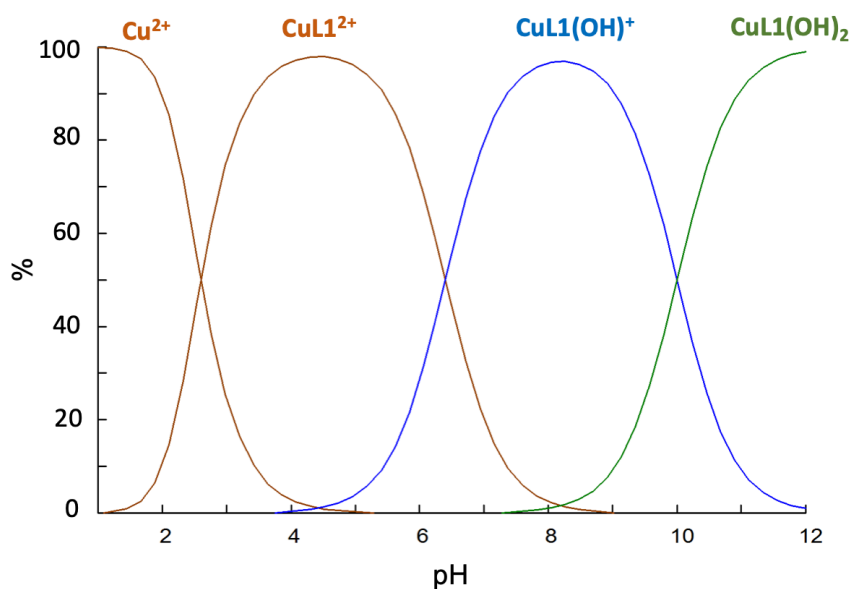


Рисунок 36. Зависимость состава водного раствора Cu^{2+} в присутствии L1 от pH.

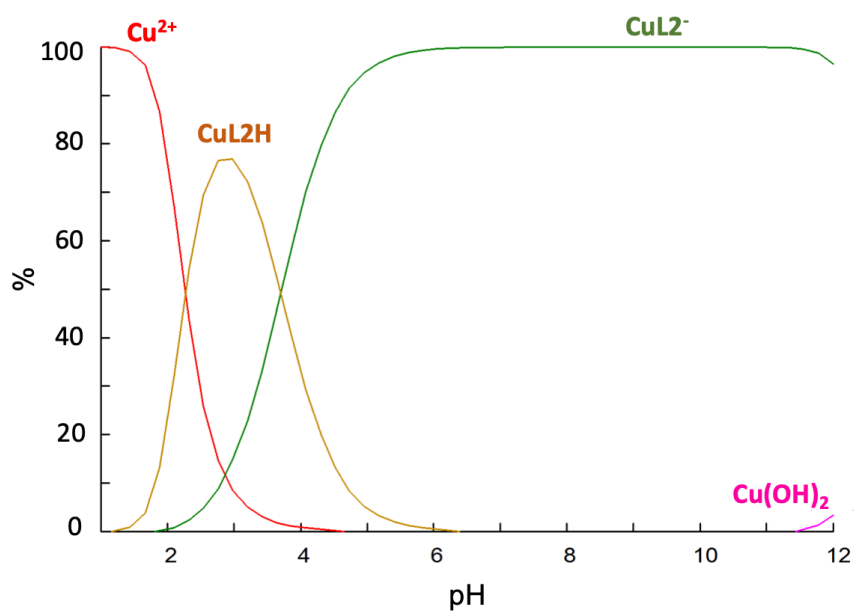


Рисунок 37. Зависимость состава водного раствора Cu^{2+} в присутствии L2 от pH.

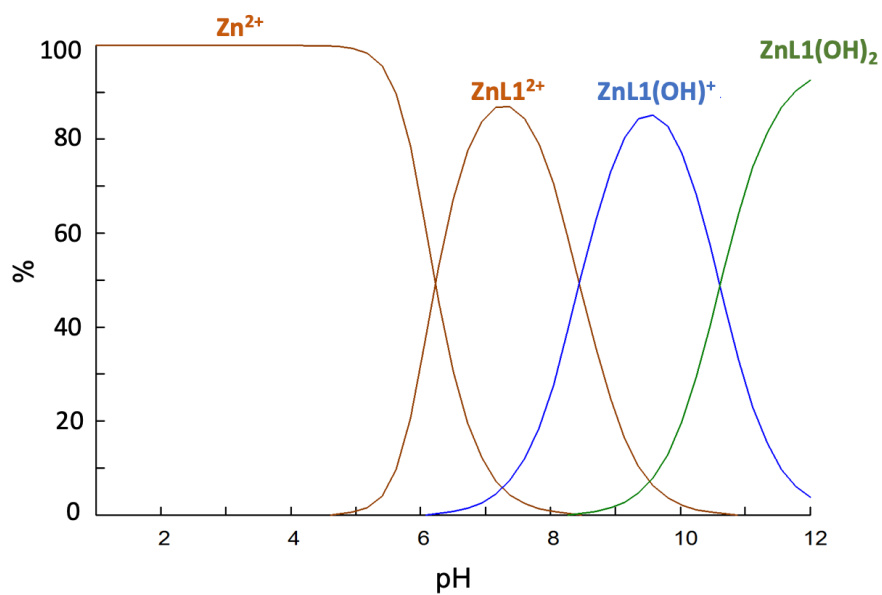


Рисунок 38. Зависимость состава водного раствора Zn^{2+} в присутствии L1 от pH.

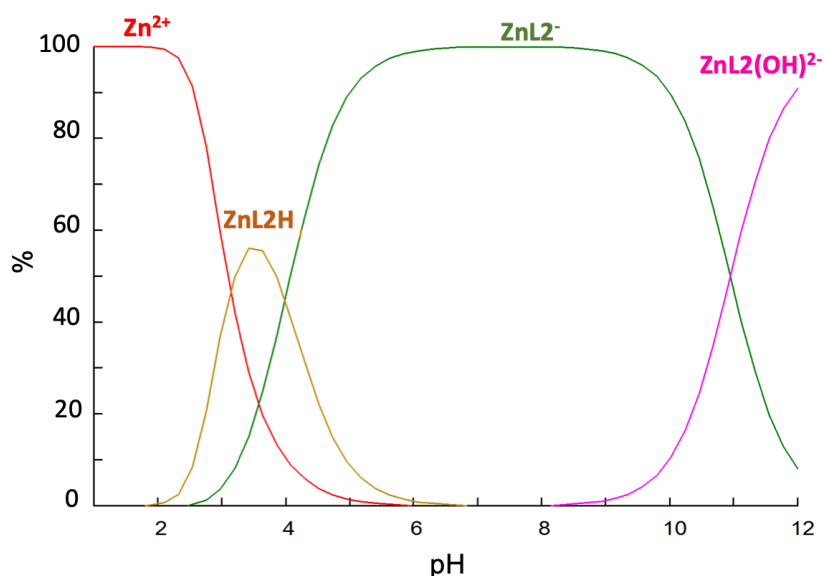


Рисунок 39. Зависимость состава водного раствора Zn^{2+} в присутствии L2 от pH.

В литературе описано несколько линейных соотношений свободных энергий реакций образования комплексов и различных свойств входящих в них катионов металлов. Одна из этих зависимостей описывает связь между логарифмом константы устойчивости комплекса и показателей констант кислотности, которая может служить для оценки значений констант комплексообразования. Эти соотношения не выводятся однозначно термодинамически, однако эта корреляция может дать некое понимание факторов, влияющих на комплексообразование. В частности, линейная зависимость свободных энергий реакций протонирования и комплексообразования говорит об отсутствии значимых стерических препятствий и значительного влияния сольватации при образовании комплекса. В случае иного характера зависимости логарифма константы комплексообразования и показателя кислотности говорят о существенном различии в механизме образования комплексных соединений [183].

На рис. 40 и 41 представлена такая зависимость для комплексов цинка и меди, на которых отображены как литературные данные [180], так и данные, полученные в настоящей работе. Полученные данные хорошо соотносятся с зависимостью для схожих по природе лигандов, что говорит об адекватности полученных данных. Стоит отдельно отметить, что из зависимости для комплексов меди на рис. 40 видно, что литературные данные для ациклических лигандов находятся в среднем выше линии зависимости, в то время как макроциклические лиганды наоборот, как правило, находятся ниже, что может быть следствием усиления стерических

препятствий при комплексообразовании. В связи с этим особенно примечательно, что исследуемые лиганды L1 и L2 скорее вписываются в закономерность для ациклических лигандов, что подчеркивает большую пространственную доступность для комплексообразования из-за большого размера макроцикла.

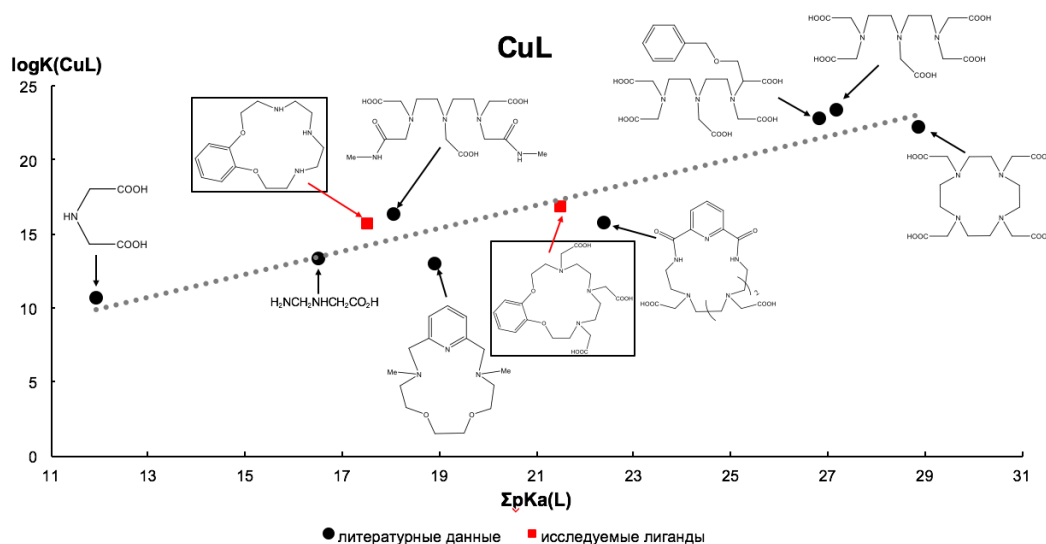


Рисунок 40. Линейное соотношение свободных энергий для комплексов меди

В то же время, если для катионов меди константы комплексообразования с L1 и L2 отличались всего на один порядок, для цинка аналогичные константы отличаются больше, чем на 6 порядков. Этот факт может быть объяснен с точки зрения теории жестких и мягких кислот и оснований Пирсона (ЖМКО). Цинк с точки зрения ЖМКО является более жесткой кислотой (параметр жесткости $\eta_A = 10,8$ для Zn^{2+} против $\eta_A = 8,3$ для Cu^{2+} [184]), в то же время третичные аминогруппы в лиганде L2 являются более жесткими основаниями по сравнению с вторичными в L1. Следовательно, более жесткая кислота имеет большее сродство к более жесткому основанию Льюиса и, как следствие, большую константу комплексообразования по сравнению с комплексом с более мягким основанием.

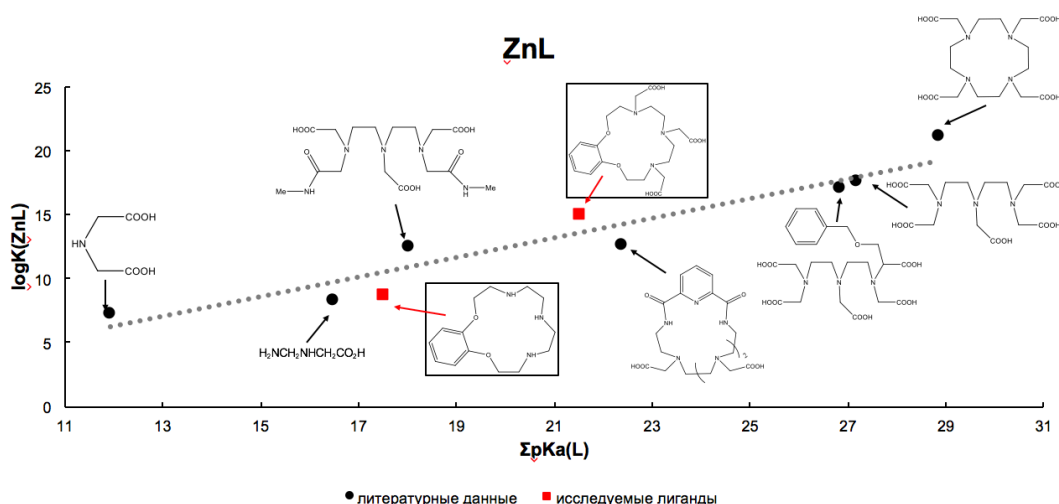


Рисунок 41. Линейное соотношение свободных энергий для комплексов цинка

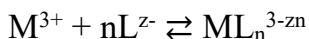
Из-за высокой степени гидролиза катиона Bi^{3+} в нейтральных и щелочных средах и образования нерастворимых соединений весьма затруднительно определять константы устойчивости с помощью потенциометрического титрования [185]. В связи с этим определение констант проводили с помощью метода конкурирующих реакций экстракции несвязанного в комплекс катиона с добавлением радиоактивной метки ^{207}Bi .

Константа устойчивости комплекса в этом случае вычислялась по следующим образом [186]:

$$D_0 = \frac{c(M^{3+})_{\text{экстр}}}{c(M^{3+})_{\text{водн}}}$$

, где D_0 – коэффициент распределение катиона между водной и органической фазой.

Если при этом лиганд находится в избытке, то возникающее химическое равновесие можно описать следующим образом:



Следовательно, выражение для константы равновесия записывается как

$$K_{\text{ML}^{3-zn}} = \frac{[\text{ML}_n^{3-zn}]}{[\text{M}^{3+}][\text{L}^{z-}]^n}$$

В таком случае коэффициент экстракции выражается следующим образом:

$$D = \frac{c(M^{3+})_{\text{экстр}}}{c(M^{3+})_{\text{водн}}} = \frac{[M^{3+}]_{\text{экстр}}}{[M^{3+}] + [ML_n^{3-zn}]} = \frac{[M^{3+}]_{\text{экстр}}}{[M^{3+}](1 + K_{ML_n}^{3-zn}[L^{z-}]^n)}$$

При этом при фиксированном значении pH концентрация депротонированной формы вычисляется по уравнению материального баланса:

$$c(H_iL) = [L^{z-}] + \sum_i [H_iL^{z-i}] = [L^{z-}] + \sum_i K_{iH}[H^+]^i[L^{z-}] = [L^{z-}](1 + \sum_i K_{iH}[H^+]^i)$$

$$\frac{D_0}{D} - 1 = \frac{K_{ML_n}}{(1 + \sum_i K_{iH}[H^+]^i)^n} c(H_iL)^n$$

$$\lg\left(\frac{D_0}{D} - 1\right) = \lg \frac{K_{ML_n}}{(1 + \sum_i K_{iH}[H^+]^i)^n} + n \cdot \lg c(H_iL)$$

Из этого следует, что по наклону графика зависимости $\lg\left(\frac{D_0}{D} - 1\right)$ от $\lg c(H_iL)$ определяется как стехиометрия комплекса, так и его константа устойчивости.

Для комплекса BiL2 подобная зависимость при pH 3 описывается линейной зависимостью с наклоном, близким к 1 (рис. 42), что соответствует образованию комплекса состава ML.

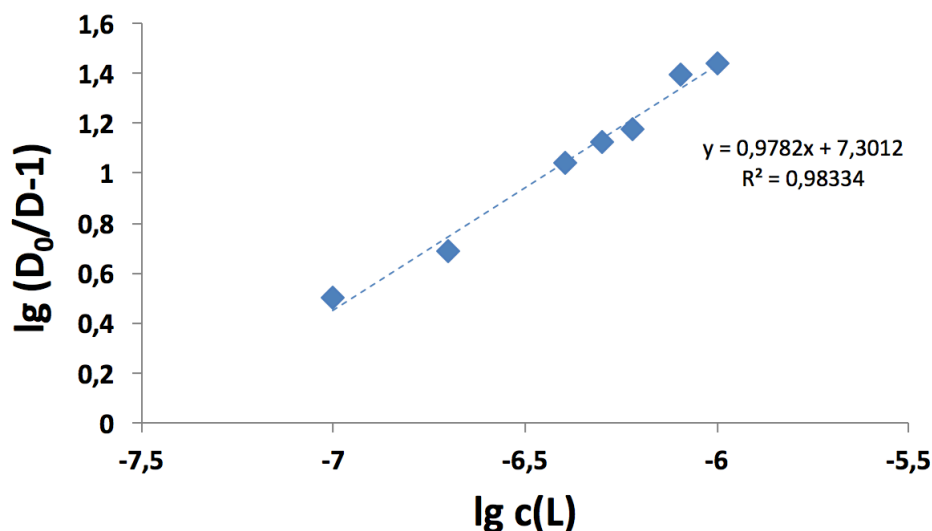


Рисунок 42. Зависимость коэффициента распределения Bi^{3+} при экстракции 0,01M Д2ЭГФК в толуоле от концентрации лигандов L2 в переменных $\lg\left(\frac{D_0}{D} - 1\right)$ от $\lg c(H_iL)$

Полученное значение константы для комплекса BiL2: $\lg K_{ML} = 21,2 \pm 0,1$.

Для определения константы устойчивости комплекса BiL1 был предпринят ряд попыток определить константу устойчивости аналогичным образом. Кроме того, была проведена серия экспериментов по осаждению нерастворимых соединений

висмута. В случае осаждения без присутствия лиганда степень осаждения составила 99%. Однако, в диапазоне концентраций L1 от $1 \cdot 10^{-7}$ М до $1 \cdot 10^{-4}$ М степень осаждения также составляла около 99%, что говорит об отсутствии устойчивого связывания катиона висмута лигандом L1. Следовательно, константа комплексообразования слишком мала для определения с помощью данного метода.

Для комплексов цинка и меди с L3 константы устойчивости были определены ранее [181], в рамках данной работы использовались уже опубликованные значения. В табл. 8 приведены $\lg K_{ML}$ для всех изучаемых в данной работе комплексов, а также константы устойчивости комплексов с DOTA, которые в дальнейшем использовались в качестве образцов сравнения.

Таблица 8. Значения логарифмов констант устойчивости изучаемых комплексов ($\lg K_{ML}$).

	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Bi^{3+}
L1	$15,6 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,1$	—
L2	$16,8 \pm 0,1$	$14,9 \pm 0,1$	$21,2 \pm 0,1$
L3	$15,8 \pm 0,1$ [181]	$12,6 \pm 0,1$ [181]	$21,3 \pm 0,2$ [187]
DOTA	$22,2$ [180]	$21,0$ [180]	$30,3 \pm 0,1$ [36]

Большинство из полученных значений констант позволяет дальнейшее исследование комплексов в качестве потенциального компонента радиофармпрепарата, относительно низкой является только константа устойчивости для ZnL1. Можно заметить, что, несмотря на схожие ионные радиусы, константы устойчивости для комплексов цинка систематически меньше, чем аналогичные константы для соединений меди. Эти результаты объясняются с помощью естественных рядов Ирвинга-Вильямса [104]: большая устойчивость комплексов меди объясняется различиями в электронном строении и геометрии комплексов – для меди характерно плоское квадратное окружение, в то время как для цинка – тетраэдрическое. Если сравнивать константы устойчивости комплексов меди и цинка, то для L1 разность констант – 6,9 порядков, для L2 – 1,9 порядков, для L3 – 3,2 порядка. Аналогичное различие в $\lg K$ комплексов меди и цинка с азакраун-эфирами без дополнительных групп и в присутствии ацетатных групп наблюдалась для диамидных пиридиновых азакраун-лигандов в [181]. Большая разность в константах при переходе от L1 к L2 для цинка обуславливается отсутствием гибких

карбоксильных групп, способных закомплексовать центральный атом: в случае Zn^{2+} это оказывается критичным из-за отличий в геометрии образующегося комплекса (тетраэдрическая, в отличие от плоской для меди), а также из-за большего сродства к кислороду. В то же время, более существенная разница между константами для L3, чем для L2, обуславливается большим радиусом полости макроциклического лиганда: радиус катиона оказывается слишком мал, и в этом случае не проявляется макроциклический хелатный эффект стабилизации комплекса, наблюдаемый в случае L2.

Исходя из полученных результатов для комплексов висмута, данный элемент не образует устойчивого комплекса с L1, в то время как с L2 образуется весьма устойчивое соединение. Данный факт опять же объясняется отсутствием в L1 дополнительных хелатирующих карбоксильных групп, обеспечивающих первичную координацию катиона, а также относительно большим ионным радиусом Bi^{3+} (1.03 Å [188]). При отсутствии карбоксильных групп и относительно малом размере макроцикла отсутствует первичная координация центрального атома кислородами COOH-групп и, как следствие, последующее хелатирование донорными атомами основной части молекулы.

Стоит отметить, что термодинамическая устойчивость является важным, но далеко не единственным фактором, который необходимо учитывать для комплекса, потенциально применяемого в медицинских целях. Как было отмечено в обзоре литературы, помимо термодинамических характеристик не менее важную роль играет кинетическая устойчивость соединения *in vitro* и *in vivo*. Так, например, в работе [189] комплексы с более низкими константами устойчивости проявляют лучшую кинетическую стабильность. В рамках данной работы было условно принято, что на следующей стадии исследования в условиях *in vitro* будут изучаться комплексы с константами устойчивости $lgK \approx 10$ и более.

Глава 5. Определение условий образования меченных комплексов

Одной из промежуточных задач является определение оптимальных условий мечения, то есть таких условий, в которых связывание радионуклида лигандом было бы максимальным. Установленных и общепринятых стандартов по необходимой степени связывания радионуклидов в радиофармпрепаратах в литературе не обнаружено. Традиционно клинически используются РФП с радиохимической чистотой $\geq 95\%$, в рамках наших поисковых исследований мы немного ослабили критерий, чтобы более широко рассмотреть возможные варианты и считали комплекс пригодным для дальнейших исследований, если связано $\geq 90\%$ радионуклида.

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

- 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
- 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, 60:1–10, 2018.

5.1 Подбор условий проведения тонкослойной хроматографии

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является рутинным методом для оценки радиохимической чистоты основного вещества радиофармпрепарата. В сочетании с методом радиоактивных индикаторов данный метод является количественным и позволяет с высокой степенью точности определять степень связывания радионуклида в комплекс. В связи с этим для каждого комплекса необходимо

подобрать условия проведения ТСХ, в которых происходит достаточное разделение областей, соответствующих комплексу и несвязанному катиону ($R_s > 1$).

Для комплексов меди и цинка было изучено их поведение в элюентах, ранее описанных в литературе как оптимальные для комплексов макроциклических лигандов [190–193]. В табл. 9 – 11 приведены условия, оптимальные для проведения ТСХ комплексов меди, цинка и висмута с L1, L2 и L3.

Таблица 9. Результаты авторадииографии пластин ТСХ комплексов меди

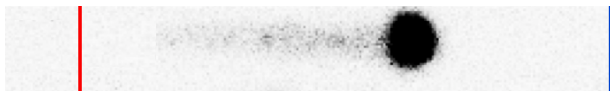
Неподвижная фаза	Элюент	Образец	Результат авторадииографии	R_f	R_s
силикагель	20% NH_4Cl : MeOH (1:1)	Cu blank		0	6,0
силикагель	20% NH_4Cl : MeOH (1:1)	CuL1		0,64	
силикагель	10% AcONH_4 : MeOH (1:1)	Cu blank		0,11	3,5
силикагель	10% AcONH_4 : MeOH (1:1)	CuL2		0,52	
целлюлоза	10% NH_4Cl : MeOH (1:1)	Cu blank		0,08	3,1
целлюлоза	10% NH_4Cl : MeOH (1:1)	CuL3		0,85	

Таблица 10. Результаты авторадииографии пластин ТСХ комплексов цинка

Неподвижная фаза	Элюент	Образец	Результат авторадииографии	R_f	R_s
силикагель	10% AcONH_4 : MeOH (1:1)	Zn blank		0	6,0
силикагель	10% AcONH_4 : MeOH (1:1)	ZnL2		0,95	

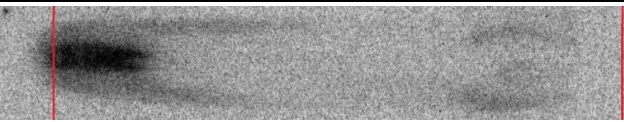
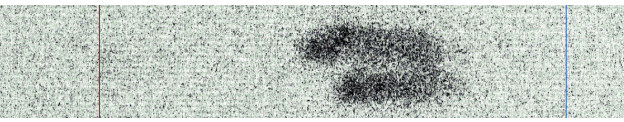
Неподвижная фаза	Элюент	Образец	Результат авторадииографии	R _f	R _s
целлюлоза	10mM NaOH в 0.9% NaCl	Zn blank		0,08	3,8
целлюлоза	10mM NaOH в 0.9% NaCl	ZnL3		0,83	

Таблица 11. Результаты авторадииографии пластин ТСХ комплексов висмута

Неподвижная фаза	Элюент	Образец	Результат авторадииографии	R _f	R _s
целлюлоза	10mM NaOH в 0.9% NaCl	Bi blank		0	3,1
целлюлоза	10mM NaOH в 0.9% NaCl	BiL2		0,57	

Для всех изучаемых на данном этапе комплексов были найдены адекватные условия проведения ТСХ, во всех случаях R_s был больше 3. В случае медных комплексов за счёт варьирования солей аммония и их соотношения с метанолом изменялась полярность подвижной фазы, что и способствовало расхождению связанного и несвязанного катиона. Один из этих же элюентов для комплекса с L2 подошёл для такого же комплекса с цинком. Однако для висмутовых комплексов элюенты на основе метанола и аммонийных солей не давали необходимого разрешения пятен, что может быть обусловлено значительным отличием химических свойств Bi³⁺, а также другого заряда образуемого комплекса BiL2 по сравнению с CuL2⁻ и ZnL2⁻. Поэтому для BiL2 был успешно использован элюент традиционно используемый для ТСХ его комплексов с полиаминокарбоксилатами 10 mM NaOH – 0,9% NaCl. В таких щелочных условиях свободный катион образует нерастворимые гидроксиды, которые остаются на старте, в то время как растворённый комплекс поднимается с фронтом элюента. Это позволило в дальнейшем проводить исследование условий получения комплексов, а также использовать ТСХ с последующей гамма-спектрометрией областей пластины как одну из стадий контроля качества. Кроме того, ТСХ в подобранных условиях была далее использована для идентификации химической формы (по фактору

удерживания), в которой радионуклид присутствует в растворе при проведении тестов в присутствии сывороточных белков.

5.2 Определение условий получения комплексов

Для минимизации потерь радиоактивности в радиофармпрепаратах концентрация хелатора должна быть достаточной для быстрого связывания радионуклида в комплекс. В то же время, чрезмерно большой избыток конъюгата приведет к связыванию с целевыми рецепторами в клетках соединений, не содержащих радиоактивной метки, что может отразиться на качестве исследования или терапии. В коммерчески используемых препаратах концентрации лиганда составляют порядка $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$ М (например, для ^{111}In OctreoscanTM – $4 \cdot 10^{-4}$ М, ^{90}Y Zevalin[®] – $1 \cdot 10^{-5}$ М). В данной работе с помощью ТСХ для изучаемых комплексов были определены радиохимические выходы реакций мечения в зависимости от концентрации лиганда при следовых концентрациях радионуклида. Задачей данного этапа исследований является подбор концентрации лиганда, при которой достигается высокая степень связывания радионуклида. Теоретическое предсказание такого значения исходя из константы устойчивости возможно, но ввиду многокомпонентности системы (присутствие рН-буфера, соляной кислоты из рабочего раствора радионуклида, ультранизких концентраций катиона ($\sim 1 \cdot 10^{-7}$ М)) целесообразно определять необходимые концентрации лиганда эмпирически в заданных условиях.

Проведение ТСХ через 10 минут после смешивания растворов лигандов и $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ показало, что при концентрациях лиганда $1 \cdot 10^{-3}$ М больше 90% радионуклида переходит в комплекс. Аналогичные эксперименты через большие промежутки времени показывают отсутствие зависимости радиохимического выхода реакции мечения от времени, что говорит о высокой скорости образования комплексных соединений. На рис. 43 представлена зависимость степени связывания метки ^{64}Cu от концентрации лигандов. Можно заметить, что уже при концентрациях L1 и L2 в $1 \cdot 10^{-4}$ М степень связывания радионуклида больше 90%, в связи с чем эти комплексы представляют интерес для исследования *in vitro*. В то же время для L3 такие значения достигаются при концентрациях $3 \cdot 10^{-4}$ М. Если сравнить полученные данные с значениями констант устойчивости комплексов (табл. 7) видно, что прямая зависимость между ними отсутствует. Данный факт помимо номинальной

многокомпонентности системы объясняется особенностью работы с меченными соединениями в сверхнизких концентрациях: химические количества катиона металла крайне малы, 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, что затем влияет на равновесные процессы в системе (в том числе процессы перехелатирования лигандом примесного катиона).

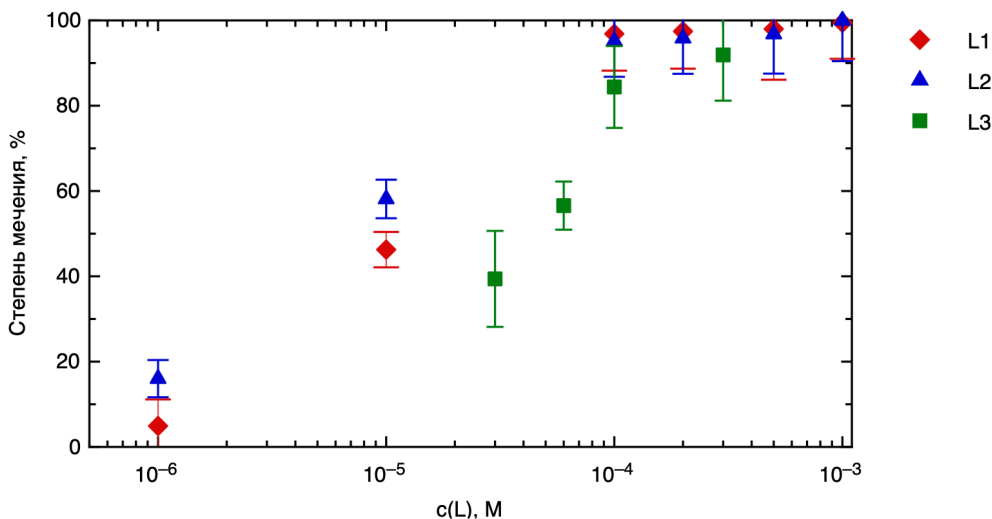


Рисунок 43. Зависимость степени мечения комплексов меди с исследуемыми лигандами в зависимости от его концентрации

В связи с наличием протонированных форм лигандов (табл. 4 и 5) целесообразным представляется исследование устойчивости комплексов меди в кислой области рН. Для комплексов CuL1 и CuL2 в рамках данной работы также изучали зависимость степени мечения от рН (табл. 12) при фиксированной концентрации лиганда (10^{-3} М) в диапазоне от 4 до 7, так как данные значения водородного показателя близки к физиологическим. Данные зависимости показывают, что в исследуемом диапазоне рН для данного макроцикла наличие или отсутствие карбоксильных групп не влияет существенно на устойчивость комплексов двухзарядной меди. Стоит отметить, что лиганды L1 и L2 в кислой области рН в значительной степени находятся в протонированной и дипротонированной форме, однако представленные результаты показывают, что этот факт не влияет на устойчивость комплекса. Данные результаты также хорошо соотносятся с распределением форм комплекса в зависимости от рН. Так, для CuL1 при рН 4–6 доминирует непротонированная форма (рис. 27), наличие гидроксидной

формы при приближении к рН 7 не сказывается на мечении лиганда из-за относительно высокой константы устойчивости $L1(Cu^{2+})(OH^-)$ ($lg\beta=9,2$). Для CuL1 в исследуемом диапазоне рН также преобладает непротонированная форма (рис. 28), ее протонирование при приближении к рН 4 не уменьшает устойчивость данного комплекса и, как следствие, не сказывается на выходе реакции мечения.

Таблица 12. Выход реакции мечения для комплексов меди при различных рН

рН	CuL1, %	CuL2, %
4	97±9	99±10
5	99±8	98±10
6	99±9	97±10
7	99±9	98±10

Аналогичные зависимости для комплексов цинка с L2 и L3 (рис. 44) показывают, что степень образования комплексов при тех же концентрациях лиганда ниже, чем в случае меди. Однако, при концентрациях, близких к $1 \cdot 10^{-3} M$ достигаются высокие значения степени мечения, что позволяет считать данные комплексы подходящими для дальнейших исследований. Стоит отметить также, что выход реакции мечения L3 цинком закономерно выше, чем L2 при тех же концентрациях, несмотря на более низкие значения констант комплексообразования (табл. 8). Последнее в совокупности с данными по получению лигандов, меченных ^{64}Cu , показывает недостаточность учёта только констант комплексообразования 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.

Проведение ТСХ после смешивания растворов лигандов и $[^{65}Zn]ZnCl_2$ показало, что при концентрациях лиганда $1 \cdot 10^{-3} M$ 10 минут достаточно для практически полного связывания катиона, при этом степень связывания радионуклида не меняется по меньшей мере в течение 1 часа, что говорит о высокой скорости комплексообразования. Зависимости степени мечения для комплексов цинка от рН в диапазоне 4÷7 не выявлено.

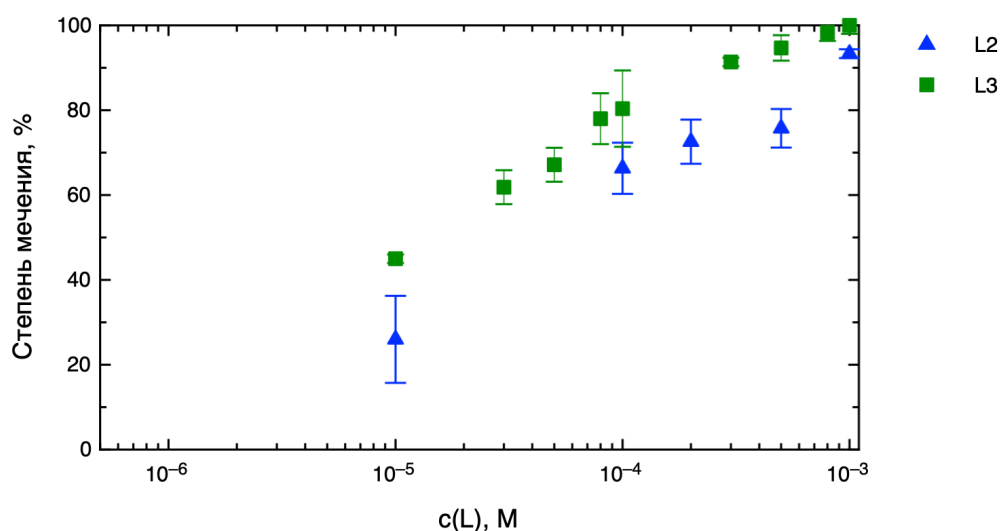


Рисунок 44. Зависимость степени мечения комплексов цинка с исследуемыми лигандами от его концентрации

Комплекс $[^{207}\text{Bi}]\text{BiL2}$ также образовывался 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. 45 представлена зависимость степени мечения BiL2 от концентрации лиганда при pH 6 и 7.

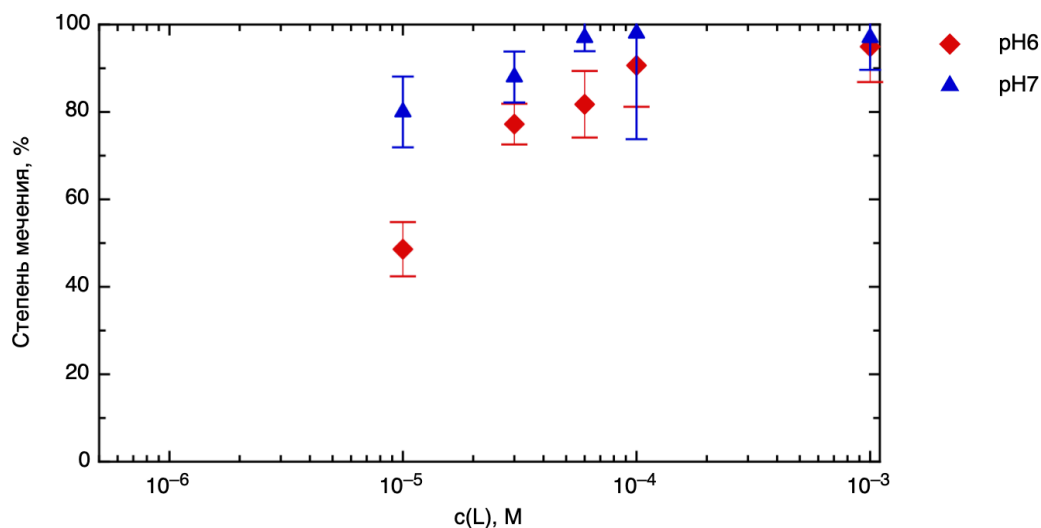


Рисунок 45. Зависимость степени мечения комплекса BiL2 в зависимости от концентрации лиганда.

С одной стороны, для комплексов катионов, склонных к гидролизу, при повышении pH следует ожидать понижения степени связывания иона в связи с образованием гидроксокомплексов и нерастворимых гидроксидов. Однако, из полученных данных следует, что при понижении pH с 7 до 6 понижается также и

степень образования комплекса. Этот факт связан с протонированием лиганда. Как видно из рис. 26 лиганд L2 при pH 6 в значительной степени переходит в протонированную форму LH_2 . Ранее в данной работе был сделан вывод, что на этой стадии протонируется уже второй атом азота в макроцикле, соответственно, два азота из трех не смогут участвовать в образовании координационной связи с висмутом. В отличие от меди и цинка, для которых даже в более кислых средах степень комплексообразования оставалась прежней, для висмута протонирование электрон-донорных атомов в макроцикле оказывается критичным в связи с бóльшим радиусом атома и, как следствие, высоким координационным числом. Сочетание этих факторов существенно снижает включение катиона в комплекс даже в слабокислых областях pH. Из этого можно сделать вывод, что оптимальными условиями связывания Bi и L2 для проведения дальнейших исследований являются концентрации выше $1 \cdot 10^{-4}$ М при pH 6–7.

Таким образом, для всех изученных комплексов были определены оптимальные условия образования комплексов. Комплексы образуются в течение коротких промежутков времени – до 10 минут, при этом концентрации лигандов адекватны для дальнейшего использования в радиофармпрепаратах.

Глава 6. Исследование устойчивости комплексов в условиях *in vitro*

В крови живого организма находится множество белков, способных перехелатировать вводимый радионуклид. В связи с этим для первичной оценки кинетической устойчивости комплекса была изучена степень связывания радионуклидов с белками, находящимися в сыворотке крови. С помощью данного эксперимента частично моделируется поведение комплекса непосредственно после его введения в организм и при его циркуляции в кровеносной системе. На данной стадии были изучены те комплексы, которые ранее показали высокую термодинамическую стабильность.

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

- 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
- E. V. Matazova, B. V. Egorova, E. A. Konopkina, G. Yu. Aleshin, A. D. Zubenko, A. A. Mitrofanov, K. V. Karpov, O. A. Fedorova, Yu. V. Fedorov, S. N. Kalmykov. Benzoazacrown compound: a highly effective chelator for therapeutic bismuth radioisotopes / MedChemComm, 10:1641-1645, 2019
- 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, 60:1–10, 2018.

6.1 Устойчивость комплексов меди

Для определения устойчивости исследуемых комплексов меди к перехелатированию в сыворотке крови использовались $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ для проведения «холостых» экспериментов, а также комплекс $[^{64}\text{Cu}]\text{CuDOTA}$ в качестве образцов сравнения.

Зависимости количества радионуклидов меди, не связанных с сывороточными белками крови, от времени представлены на рис. 46. Можно заметить, что комплекс CuL1 практически сразу перехелатировался веществами, находящимися в сыворотке, и показывал практически такое же поведение, как раствор хлорида меди. При этом для комплекса CuL2, несмотря на то что его константа устойчивости отличается всего на один порядок, характерна лучшая стабильность в сыворотке. Такая разница в поведении связана с особенностями координационной химии меди: для нее характерно 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+} .

Сравнивая результаты данной серии экспериментов для комплексов исследуемых лигандов и CuDOTA очевидно, что комплексы меди с L1, L2 и L3 не проявляют устойчивости в присутствии сывороточных белков и перехелатируются ими в течение нескольких часов. При проведении ТСХ маточного раствора (фракции, не связанной с белками) установлено, что метка не связывается в иные чем изначальный комплекс соединения, остающиеся в растворе: согласно автордиографии соответствующих пластин радионуклид поднимается с элюентом до тех же значений R_f , что и соответствующие комплексы. Однако, такая кинетика диссоциации не позволяет применять данные комплексы в качестве компонента радиофармпрепарата с ^{64}Cu и ^{67}Cu , период полураспада которых больше, чем время, в течение которого радионуклиды будут находиться в виде комплекса ($T_{1/2}(^{64}\text{Cu}) = 12,7$ ч, $T_{1/2}(^{67}\text{Cu}) = 61,8$ ч).

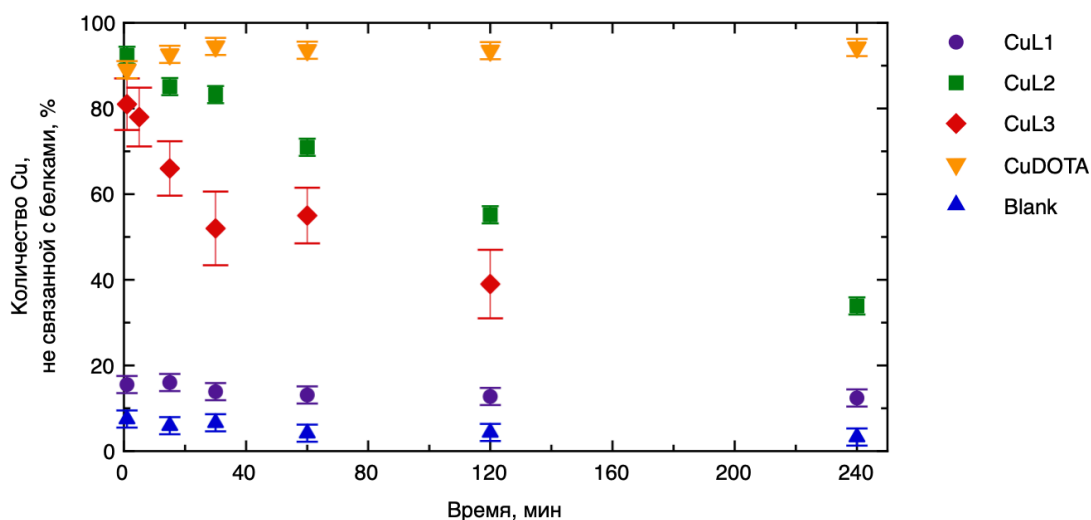


Рисунок 46. Степень связывания радионуклидов меди сывороточными белками в зависимости от времени

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 $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ необходимы данные по устойчивости комплекса L2 с материнским радионуклидом, приведенные в следующей части данной главы.

6.2 Устойчивость комплексов цинка

Для комплексов цинка с L2, L3 была также проанализирована их устойчивость в сыворотке крови (рис. 47). В качестве образцов сравнения использовались $^{65}\text{Zn}[\text{ZnCl}_2]$ и комплекс $^{65}\text{Zn}[\text{ZnDOTA}]$. Как следует из представленных зависимостей, комплексы ZnL2 и ZnL3 проявляют высокую стабильность: радионуклид в исследуемых комплексах очень слабо перехелатируется сывороточными белками, в то время как в случае «холостого» эксперимента цинк практически сразу связывается имеющимися в сыворотке соединениями.

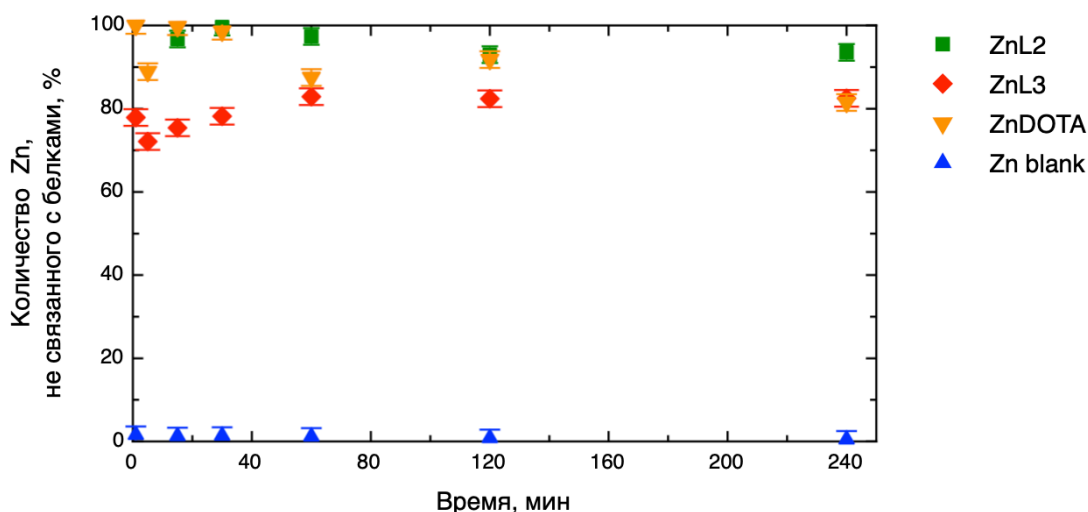


Рисунок 47. Степень связывания радионуклидов цинка сывороточными белками в зависимости от времени

Интересным представляется сравнение комплексов ZnL2 и ZnL3 с аналогичными комплексами для меди. В условиях *in vitro* комплексы цинка проявляют гораздо лучшую стабильность, чем соединения меди с теми же лигандами, в то время как полученные значения констант устойчивости для CuL2 и CuL3 на несколько порядков выше, чем для ZnL2 и ZnL3 соответственно. Такую кинетическую устойчивость можно объяснить особенностями строения 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 $[^{65}\text{Zn}]\text{ZnDOTA}$. Кроме того, возможно использование ZnL2 в качестве *in vivo* генератора $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ в связи с относительной устойчивостью CuL2 в сыворотке.

6.3 Устойчивость комплексов висмута

Аналогичная серия экспериментов по исследованию устойчивости в сыворотке крови была проделана для отобранных комплексов BiL2 и BiL3 (рис. 48).

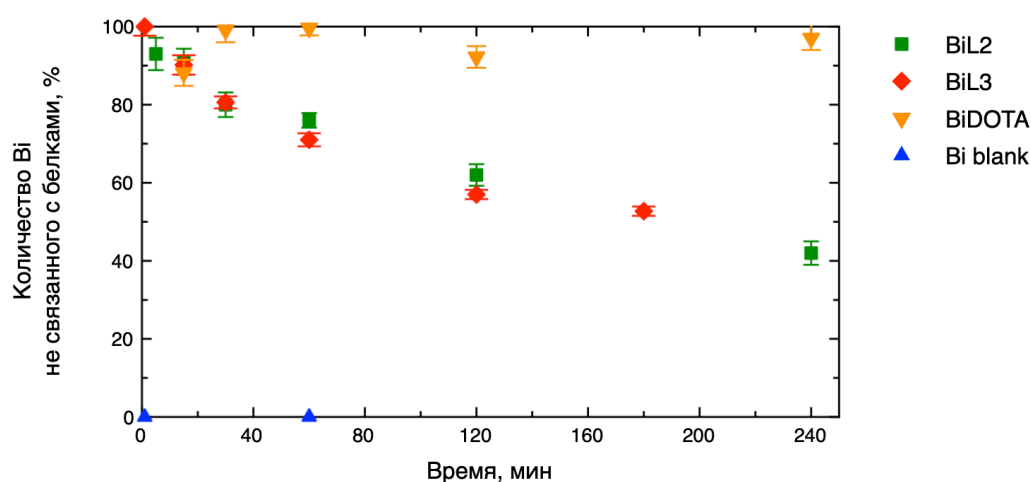


Рисунок 48. Степень связывания радионуклидов висмута сывороточными белками в зависимости от времени

Как видно, BiL2 и BiL3 относительно быстро и одинаково диссоциируют в присутствии белков по сравнению с BiDOTA, что в данном случае определяется близкими значениями констант комплексообразования (табл. 8). Однако, необходимо принимать во внимание также период полураспада радионуклидов висмута, потенциально применимых в целях ядерной медицины (^{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 существования радионуклида большая его часть будет связана с лигандом. Следовательно, данные комплексы также представляют интерес для дальнейших исследований в рамках данной работы.

Исходя из представленных выше данных по устойчивости комплексов в сыворотке крови, 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.

Глава 7. 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. Координационное окружение катиона металла может играть решающую роль в устойчивости комплекса из-за наличия или отсутствия стерических препятствий для перехелатирования центрального атома. В данной главе приведены данные о строении соединений ZnL_2 , ZnL_3 и BiL_2 , полученные с помощью спектрометрии ядерно-магнитного резонанса, рентгеноструктурного анализа, а также ранее опубликованные данные о структуре BiL_3 , полученные по результатам квантово-механических расчетов.

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

- 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

7.1 Строение комплексов ZnL_2 и ZnL_3

Изучение строения комплексов ZnL_2 и ZnL_3 в растворе проводилось с помощью спектроскопии ЯМР. Спектры ЯМР для L_2 и комплекса ZnL_2 (рис. 49) показывают, что при комплексообразовании эквивалентные атомы водорода становятся неэквивалентными, и среди атомов, находящихся в макроцикле, можно выделить аксиальные и экваториальные. Из этого следует, что при образовании данного комплекса возникает асимметрия из-за координирования карбоксильными группами и тетраэдрического окружения цинка. В то же время, комплекс продолжает оставаться симметричным относительно горизонтальной плоскости. Спектр при этом имеет однозначную интерпретацию, что говорит об образовании единственного комплекса с жесткой структурой. Алифатическая область спектра имеет две пары сигналов от атомов водорода CH_2 -групп, соседних с

карбоксильными группами, а также 8 сигналов от CH_2 -групп в макроцикле. В совокупности это приводит к выводу, что комплекс имеет C_2 -симметрию. 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.

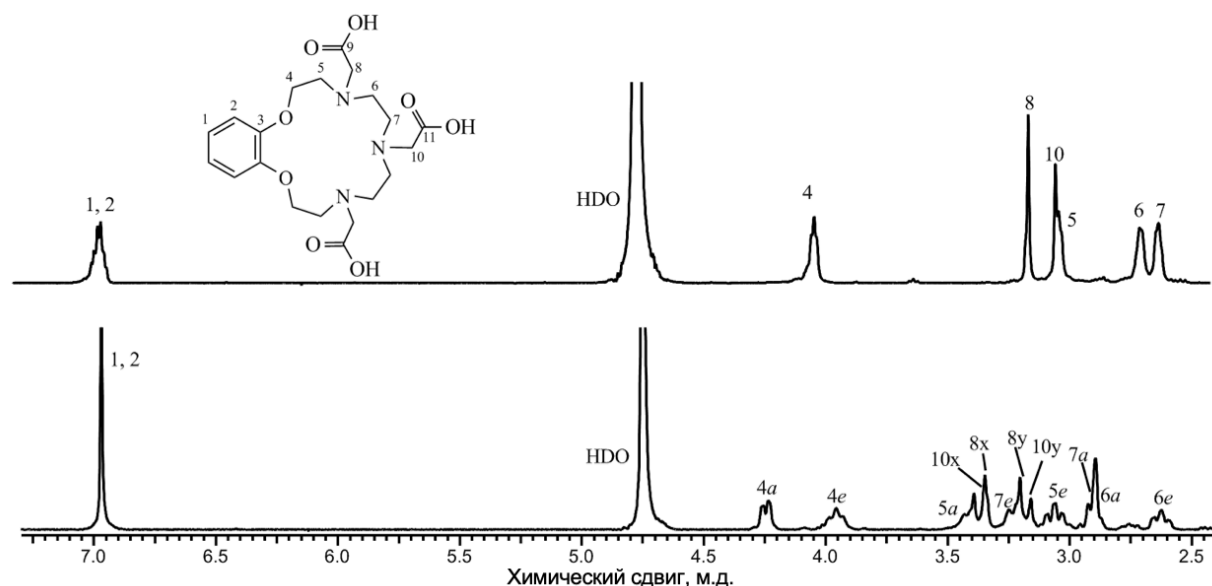


Рисунок 49. Спектры ^1H -ЯМР лиганда L2 (сверху) и комплекса ZnL2 (снизу)

В то же время, сравнение ЯМР-спектров L3 и ZnL3 (рис. 50) показывает, что при образовании комплекса с цинком происходит размывание сигналов, характерных как для протонов, связанных с атомами углерода в макроцикле, так и для протонов, связанных с атомами углерода в пиридиновом фрагменте. Данный факт можно объяснить существованием различных вариантов координации атома металла, а также легким переходом комплекса между конформациями. При этом, судя по имеющимся данным, время перехода между конформациями меньше, чем время набора спектра. Данные динамические внутримолекулярные переходы становятся возможными из-за несоответствия между размером макроцикла L3 (2,8 – 3,2 Å [181]) и диаметром катиона Zn^{2+} (1,5 Å [194]).

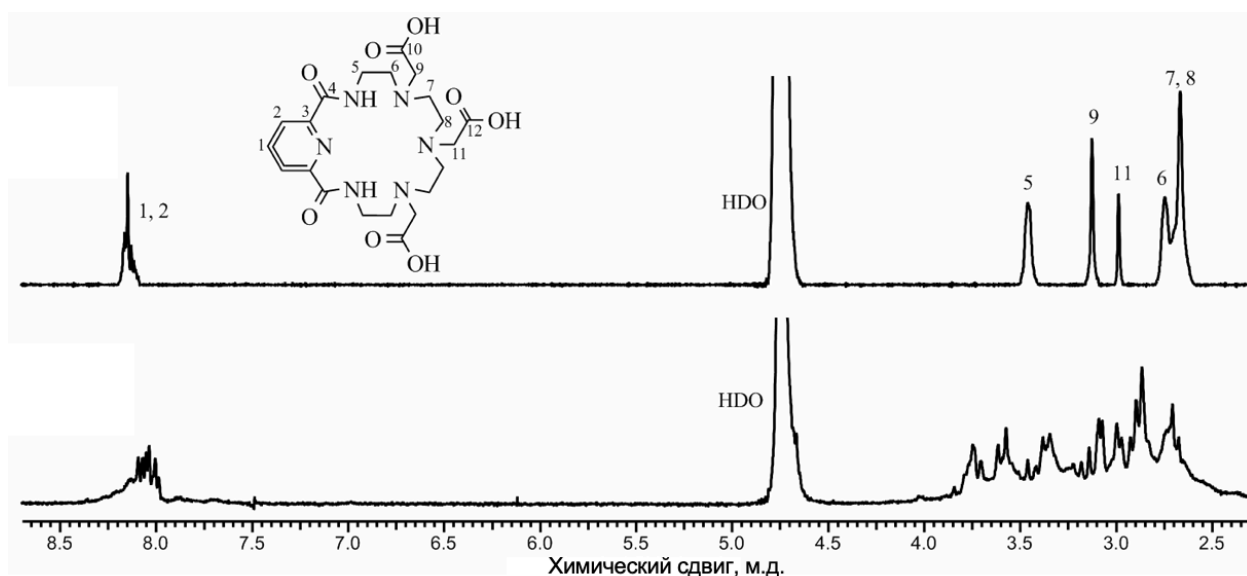


Рисунок 50. Спектры ^1H -ЯМР лиганда L3 (сверху) и комплекса ZnL3 (снизу)

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, проведенного для монокристалла ZnL3, катион Zn^{2+} координируется фрагментом $\text{NR-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NR-}$ молекулы L3 и двумя карбоксильными группами, при этом Zn^{2+} расположен вне полости макроцикла (рис. 51). 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 может сказаться на устойчивости этого комплекса *in vivo*.

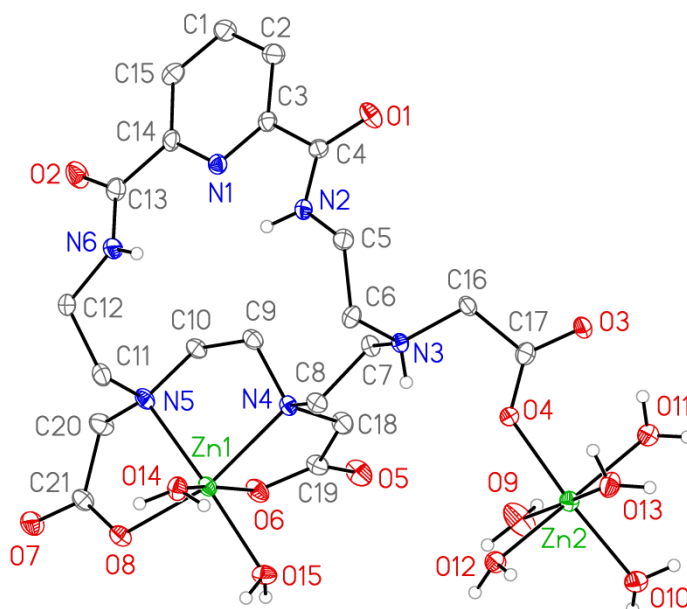


Рисунок 51. Структура катиона в кристаллической решетке ZnL3, полученная по результатам рентгеноструктурного анализа

7.2 Строение комплексов BiL2 и BiL3

Строение комплексов BiL2 и BiL3 было проанализировано с помощью ^1H -ЯМР (рис. 52 и 53). Анализируя полученные результаты, установлено, что при связывании лигандом L2 катионов Bi^{3+} образуется комплекс, обладающий жесткой структурой с C_2 -симметрией, о чем свидетельствует наличие в спектрах ЯМР различных сигналов для геминальных протонов. Стоит отметить, что две противоположно расположенные карбоксильные группы фиксированы, а третья (центральная) карбоксильная группа вращается, поскольку для нее не наблюдается расщепление сигналов протонов CH_2 -группы. При этом все гетероатомы в макроцикле лиганда участвуют в координации катиона металла.

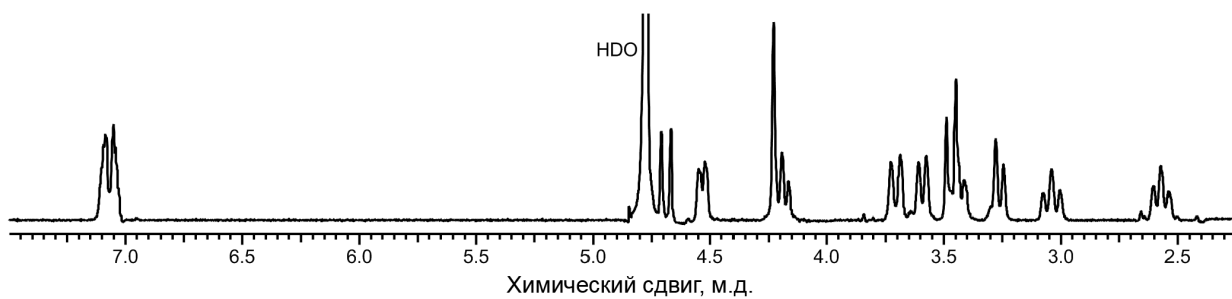


Рисунок 52. Спектр ^1H -ЯМР комплекса BiL2

При образовании комплекса Bi^{3+} с L3 сигналы, соответствующие атомам водорода в макроцикле, смещаются с 2,75 – 3,8 м.д. до 3,5 – 4,5 м.д., сигналы атомов водорода в пиридиновом кольце – с 8,0 до 8,8 м.д.. Этот факт говорит о том, что происходит координирование катиона металла всеми атомами азота в макроцикле, в том числе находящимся в пиридиновом фрагменте. Как и в случае с комплексом ZnL3 происходит размывание сигналов, что в данном случае также говорит о наличии динамических процессов перехода молекул комплекса BiL3 между различными конформациями.

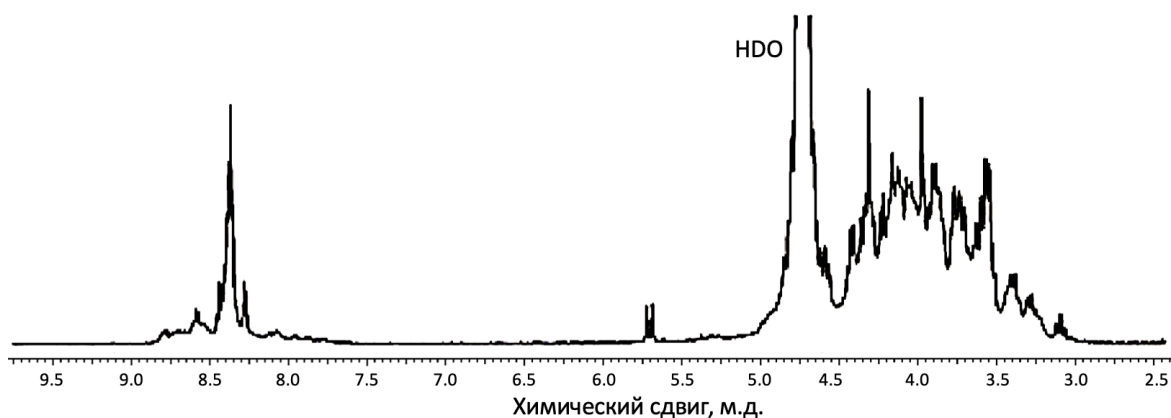


Рисунок 53. Спектр ^1H -ЯМР комплекса BiL3

Структура комплекса BiL2 дополнительно была проанализирована с помощью рентгеноструктурного анализа. Из представленной на рис. 54 структуры BiL2 видно, что катион висмута, несмотря на насыщенное координационное окружение, остается стерически доступным, что можно объяснить наличием у Bi^{3+} асимметрической электронной пары.

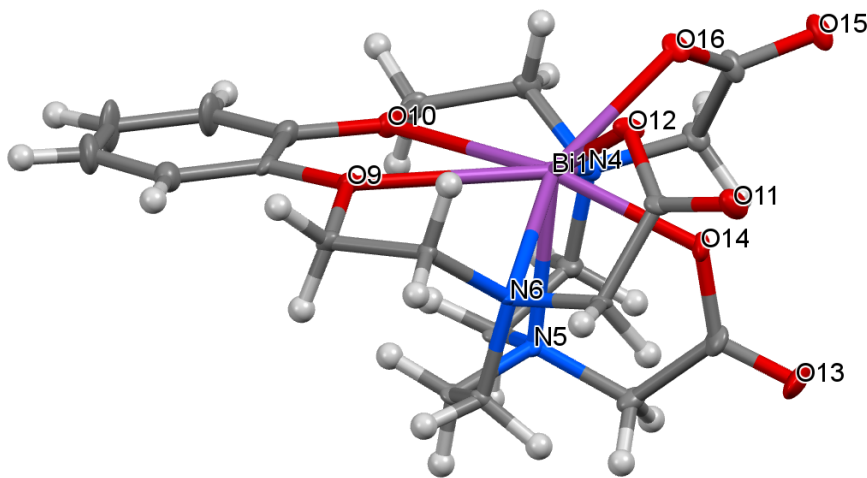


Рисунок 54. Структура BiL2, полученная по результатам рентгеноструктурного анализа.

Для комплекса BiL3 ранее была смоделирована структура с использованием теории функционала плотности [187] (рис. 55). В отличие от структуры BiL2, катион висмута в BiL3 лучше экранирован атомами лиганда. Такое отличие в строении может быть одним из ключевых факторов в сравнительной устойчивости комплексов в условиях живого организма.

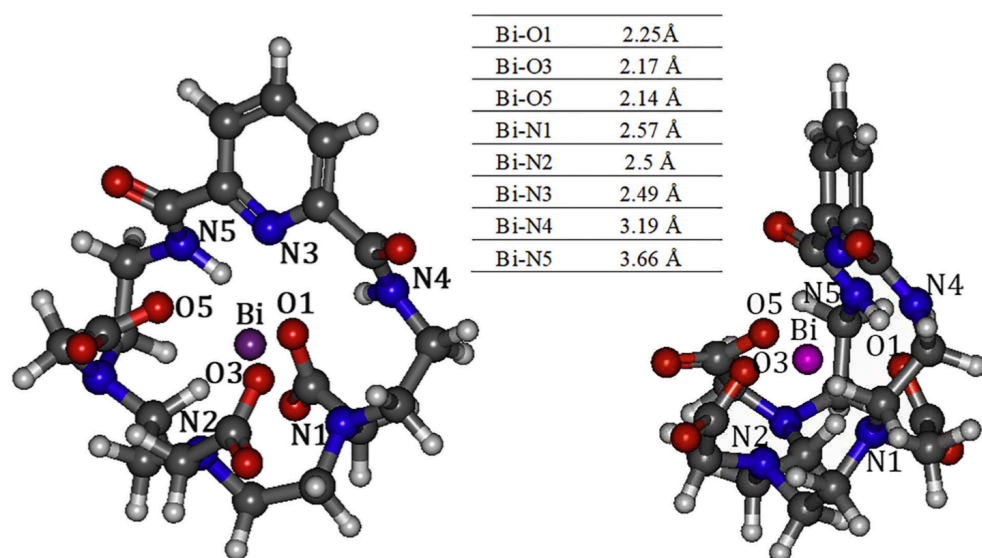


Рисунок 55. Структура BiL3, полученная с помощью квантово-химического моделирования [187]

Глава 8. Исследование устойчивости комплексов *in vivo*

Целью исследований поведения комплексов без вектора *in vivo* на здоровых мышах являлось изучение распределения исследуемых соединений и, как следствие, устойчивости комплекса в условиях живого организма. Одним из методов для достижения этой цели является сравнение распределения комплекса с 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*.

При выборе метода введения препарата необходимо учитывать его возможный метаболизм на стадии всасывания в кровь. Из всех методов наименее разрушительны для препарата интраперитониальный (внутрибрюшинный) и внутривенный. При внутривенном методе отсутствует в принципе стадия всасывания препарата в кровь, однако при его проведении на малых грызунах зачастую требуется учитывать количество препарата, оставшегося в месте введения. При интраперитониальном методе введения препарат довольно быстро попадает в кровоток и уже через час его распределение не отличается от внутривенного введения [195].

При подготовке данной главы диссертации использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В.Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

- 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
- 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, 60:1–10, 2018.

8.1 Устойчивость комплексов цинка

Полученные данные о распределении меченных комплексов цинка приведены на рис. 56 и 57. Данные приведены в процентах от введенной дозы на грамм органа или ткани.

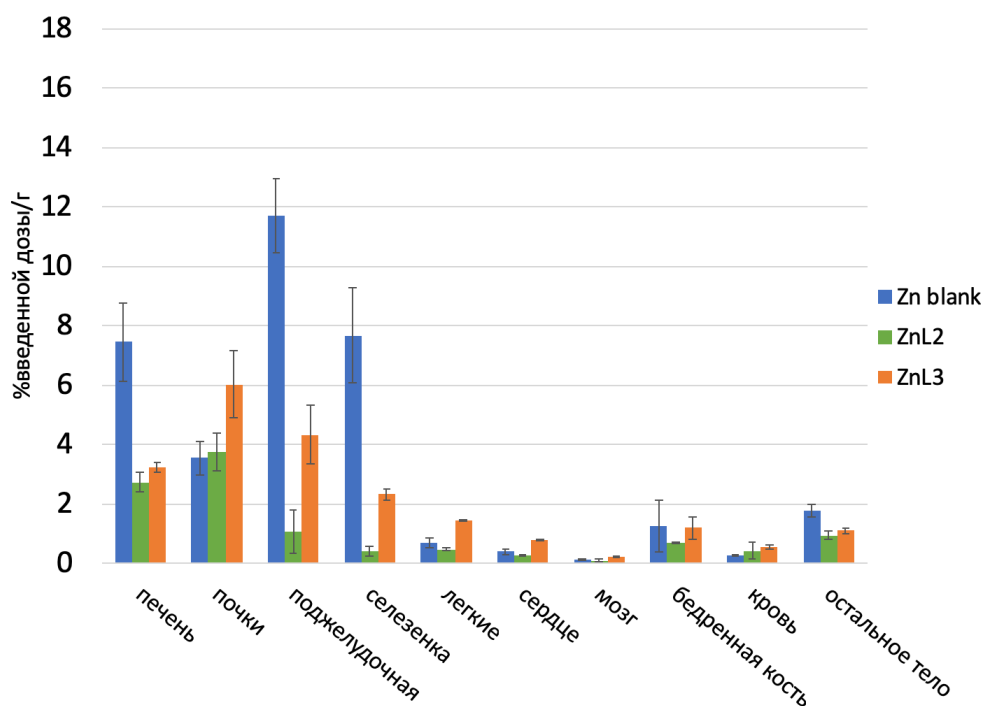


Рисунок 56. Распределение меченных соединений цинка по организму через 1 час после инъекции

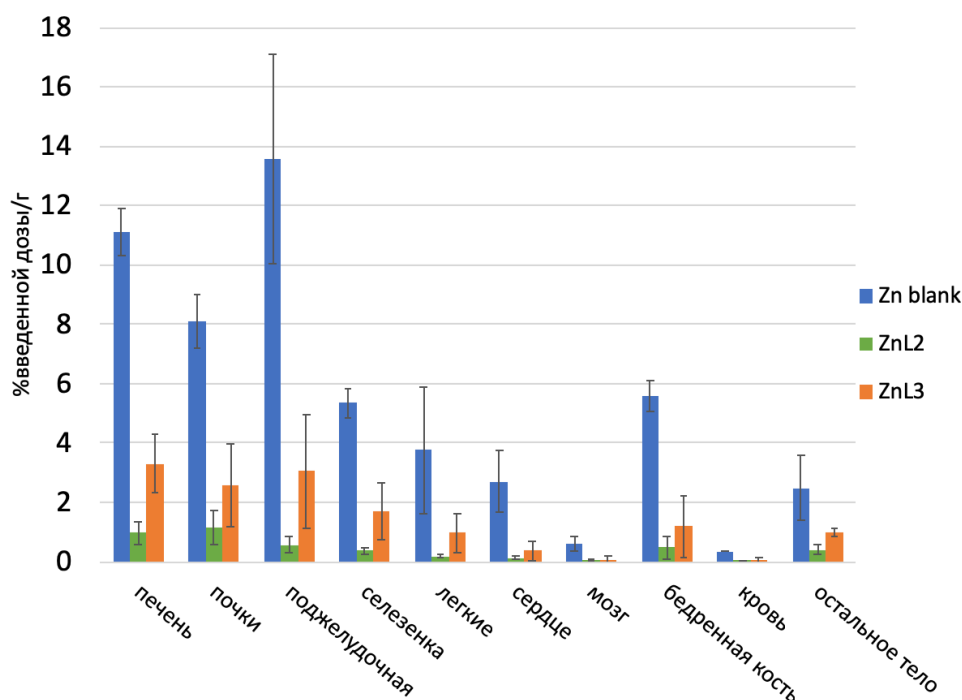


Рисунок 57. Распределение меченных комплексов цинка по организму через 6 часов после инъекции

Из представленных результатов следует, что катионы цинка, не связанные изначально в комплекс, накапливаются преимущественно в поджелудочной железе, печени, почках, а также через 6 часов в костной ткани, что согласуется с ролью цинка в метаболизме [160]. 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.

Для подтверждения данной гипотезы была проведена тонкослойная хроматография для образца мочи, отобранной у мышей, участвовавших в эксперименте, после эвтаназии непосредственно из мочевого пузыря. Образцы использовались без предварительной очистки. Изображения пластин ТСХ, полученных с помощью автордиографии, приведены на рис. 58. Условия проведения ТСХ для отобранных образцов совпадали с условиями для соответствующих комплексов, определенными в главе 5 данной работы. Согласно полученным данным, через 1 и 6 часов после введения ZnL2 радионуклид выводится из организма в связанном виде, в отличие от образцов, полученных после инъекции

«холостого» образца. В то же время для ZnL3 замечено, что через 1 час после введения метка распределяется по пластине ТСХ в двух областях, одна из которых соответствует катионам цинка, не связанным в комплекс. Это может свидетельствовать о частичной диссоциации комплекса ZnL3 в организме.

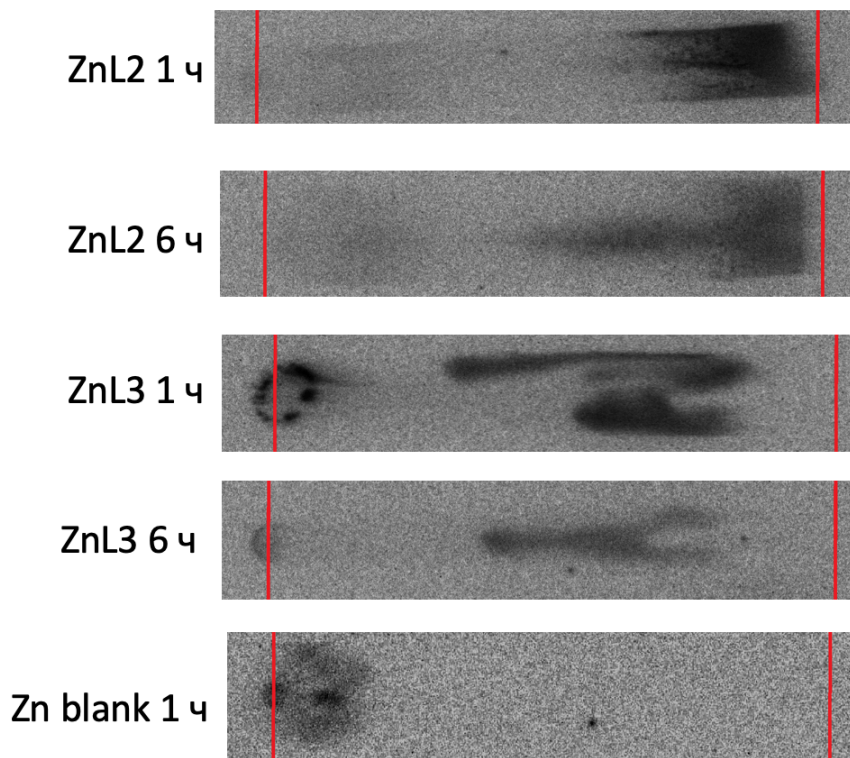


Рисунок 58. ТСХ образцов мочи, отобранных постмортально, через указанные временные промежутки после инъекции препарата

Таким образом можно сделать вывод, что комплексы цинка проявляют высокую стабильность как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом ZnL3 частично диссоциирует 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. Использование лиганда L2 также возможно как хелатора для ^{62}Zn : полученный комплекс можно рассматривать как *in vivo* генератор ^{62}Cu в связи с тем, что оба комплекса (ZnL2 и CuL2) являются термодинамически устойчивыми, при этом скорость диссоциации CuL2 в сыворотке крови меньше, чем скорость распада ^{62}Cu . Подводя итог, из представленных результатов можно сделать вывод о

перспективности изучения комплекса ZnL2 как потенциального компонента радиофармпрепарата.

8.2 Устойчивость комплексов висмута

При проведении экспериментов *in vivo* с комплексами висмута в качестве образца сравнения использовали комплекс $[^{207}\text{Bi}]\text{BiEDTA}$. Непосредственное использование растворов $[^{207}\text{Bi}]\text{Bi}^{3+}$ невозможно в связи с гидролизом последнего с образованием нерастворимого гидроксида и гидроксокомплексов и, как следствие, недостоверностью получаемых данных. При этом известно, что $[^{207}\text{Bi}]\text{BiEDTA}$ характеризуется высокой скоростью диссоциации в условиях *in vivo* [82,83,196]. Результаты измерений представлены на рис. 59 и 60.

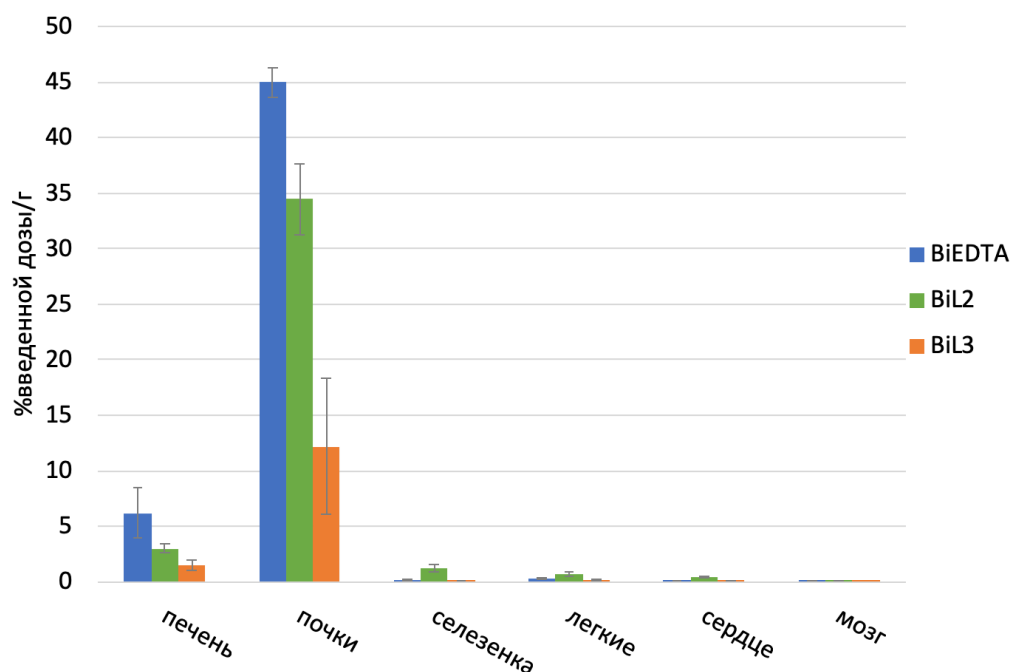


Рисунок 59. Распределение меченных комплексов висмута по организму через 1 час после инъекции

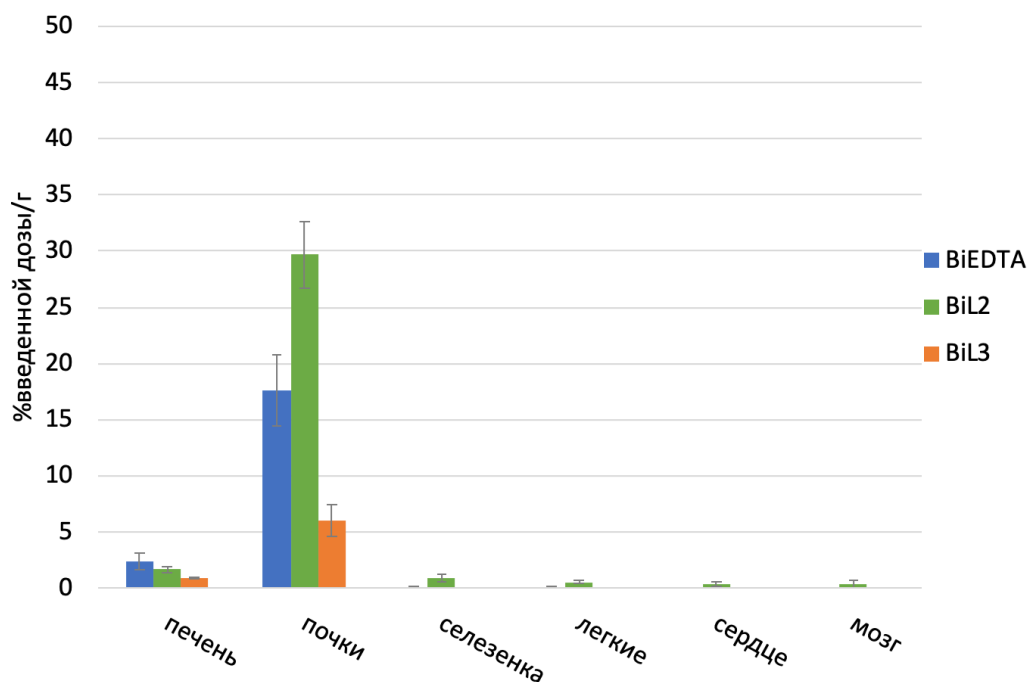


Рисунок 60. Распределение меченных комплексов висмута по организму через 6 часов после инъекции

Полученные данные показывают, что комплекс $[^{207}\text{Bi}]\text{BiEDTA}$, 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, 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. Такое различие в стабильности можно объяснить исходя из данных о структуре BiL2, описанных в предыдущей главе: центральный атом металла в BiL2 является более стерически доступным для внешних хелаторов из-за ненасыщенной координационной сферы катиона, 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 $^{69\text{m}}\text{Zn}$ из продуктов облучения металлических мишеней с использованием ионообменной хроматографии, позволяющие с выходом $\geq 92\%$ получить продукт с радионуклидной чистотой более 99%.
- Определены значения констант устойчивости комплексов Cu^{2+} , Zn^{2+} и Bi^{3+} с новыми азкараун-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 $1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-3}$ М. Для BiL2 выход реакции мечения понижается при уменьшении pH в отличие от аналогичных комплексов Cu^{2+} и Zn^{2+} в связи с большим 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 $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$.

- Комплекс BiL3 устойчив *in vivo*, не проявляя накопления в органах лабораторной мыши, в отличие от BiL2, что связано с большей стерической доступностью центрального атома в макроцикле меньшего размера L2.

Список литературы

1. Кодина Г.Е., Красикова Р.Н. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. Москва: Московский энергетический институт, 2014.
2. Anger H.O. A new instrument for mapping gamma-ray emitters // *Biology and Medicine Quarterly Report UCRL*. 1957. Vol. 3653. P. 38.
3. Cherry S.R., Sorenson J.A., Phelps M.E. *Physics in Nuclear Medicine* // *Physics in Nuclear Medicine (Fourth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2012. v–vi p.
4. Bolton A.E. *Radioiodination techniques*. United Kingdom: Radiochemical Centre, 1977.
5. Vermeulen K., Vandamme M., Bormans G., Cleeren F. Design and Challenges of Radiopharmaceuticals // *Seminars in Nuclear Medicine*. 2019. Vol. 49, № 5. P. 339–356.
6. Paans A.M.J., Van Waarde A., Elsinga P.H., Willemsen A.T.M., Vaalburg W. Positron emission tomography: The conceptual idea using a multidisciplinary approach // *Methods*. 2002. Vol. 27, № 3. P. 195–207.
7. Beyer T., Townsend D.W., Brun T., Kinahan P.E., Charron M., Roddy R., Jerin J., Young J., Byars L., Nutt R. A combined PET/CT scanner for clinical oncology // *Journal of Nuclear Medicine*. 2000. Vol. 41, № 8. P. 1369–1379.
8. Huebner R.H., Park K.C., Shepherd J.E., Schwimmer J., Czernin J., Phelps M.E., Gambhir S.S. A meta-analysis of the literature for whole-body FDG PET detection of recurrent colorectal cancer // *Journal of Nuclear Medicine*. 2000. Vol. 41, № 7. P. 1177–1189.
9. Cherry S.R., Gambhir S.S. Use of positron emission tomography in sarcoidosis // *Revue de Medecine Interne*. 2011. Vol. 32, № 2. P. 101–108.
10. Gutfilen B., Souza S.A.L., Valentini G. Copper-64: A real theranostic agent // *Drug Design, Development and Therapy*. 2018. Vol. 12. P. 3235–3245.
11. Blower P.J., Lewis J.S., Zweit J. Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine // *Nuclear Medicine and Biology*. 1996. Vol. 23, № 8. P. 957–980.
12. Lewis J.S., Laforest R., Buettner T.L., Song S.K., Fujibayashi Y., Connett J.M., Welch M.J. Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): An agent for radiotherapy // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America. 2001. Vol. 98, № 3. P. 1206–1211.
13. Lewis J.S., Lewis M.R., Cutler P.D., Srinivasan A., Schmidt M.A., Schwarz S.W., Morris M.M., Miller J.P., Anderson C.J. Radiotherapy and dosimetry of ^{64}Cu -TETA-Tyr3-octreotate in a somatostatin receptor-positive, tumor-bearing rat model // *Clinical Cancer Research*. 1999. Vol. 5, № 11. P. 3608–3616.
 14. Obata A., Kasamatsu S., Lewis J.S., Furukawa T., Takamatsu S., Toyohara J., Asai T., Welch M.J., Adams S.G., Saji H., Yonekura Y., Fujibayashi Y. Basic characterization of ^{64}Cu -ATSM as a radiotherapy agent // *Nuclear Medicine and Biology*. 2005. Vol. 32, № 1. P. 21–28.
 15. Fujibayashi Y., Cutler C., Anderson C., McCarthy D., Jones L., Sharp T., Yonekura Y., Welch M. Comparative studies of Cu-64-ATSM and C-11-Acetate in an acute myocardial infarction model: ex vivo imaging of hypoxia in rats // *Nuclear Medicine and Biology*. 1999. Vol. 26, № 1. P. 117–121.
 16. Ikawa M., Okazawa H., Kudo T., Kuriyama M., Fujibayashi Y., Yoneda M. Evaluation of striatal oxidative stress in patients with Parkinson's disease using [^{62}Cu]ATSM PET // *Nuclear Medicine and Biology*. 2011. Vol. 38, № 7. P. 945–951.
 17. Pagani M. Towards new horizons in brain PET // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011. Vol. 38, № 6. P. 1072–1074.
 18. Boros E., Packard A.B. Radioactive Transition Metals for Imaging and Therapy: review-article // *Chemical Reviews*. 2019. Vol. 119, № 2. P. 870–901.
 19. Ahmedova A., Todorov B., Burdzhiev N., Goze C. Copper radiopharmaceuticals for theranostic applications // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 157. P. 1406–1425.
 20. Shokeen M., Anderson C.J. Molecular Imaging of Cancer with Copper-64 Radiopharmaceuticals and Positron Emission Tomography (PET) // *Accounts of Chemical Research*. 2009. Vol. 42, № 7. P. 832–841.
 21. Volkert W.A., Hoffman T.J. Therapeutic Radiopharmaceuticals // *Chemical Reviews*. 1999. Vol. 99, № 9. P. 2269–2292.
 22. Dash A., Knapp F.F., Pillai M. Targeted Radionuclide Therapy - An Overview // *Current Radiopharmaceuticals*. 2014. Vol. 6, № 3. P. 152–180.
 23. Allen B.J., Raja C., Rizvi S., Song E.Y., Graham P. Tumour anti-vascular alpha therapy: A mechanism for the regression of solid tumours in metastatic cancer //

- Physics in Medicine and Biology. 2007. Vol. 52, № 13.
24. Saha G.B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. New York: Springer-Verlag, 2010. 410 p.
 25. Luna Pais H., Alho I., Vendrell I., Mansinho A., Costa L. Radionuclides in oncology clinical practice – review of the literature // Dalton Transactions. 2017. Vol. 46, № 42. P. 14475–14487.
 26. Carlsson J., Forssell Aronsson E., Hietala S.-O., Stigbrand T., Tennvall J. Tumour therapy with radionuclides: assessment of progress and problems // Radiotherapy and Oncology. 2003. Vol. 66, № 2. P. 107–117.
 27. Holland J.P., Williamson M.J., Lewis J.S. Unconventional Nuclides for Radiopharmaceuticals // Molecular Imaging. 2010. Vol. 9, № 1. P. 1–20.
 28. Kostelnik T.I., Orvig C. Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy: review-article // Chemical Reviews. 2019. Vol. 119, № 2. P. 902–956.
 29. Edem P., Fonslet J., Herth M., Kjær A., Severin G. In vivo radionuclide generators for diagnostics and therapy Release and redistribution of daughter radionuclides // Bioinorganic Chemistry and Applications. 2016. Vol. 2016. P. 1–8.
 30. Price E.W., Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals // Chemical Society Reviews. 2014. Vol. 43, № 1. P. 260–290.
 31. Byegård J., Skarnemark G., Skålberg M. The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 1999. Vol. 241, № 2. P. 281–290.
 32. Stimmel J.B., Kull F.C. Samarium-153 and Lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands // Nuclear Medicine and Biology. 1998. Vol. 25, № 2. P. 117–125.
 33. Hancock R.D. Chelate ring size and metal ion selection: The basis of selectivity for metal ions in open-chain ligands and macrocycles // Journal of Chemical Education. 1992. Vol. 69, № 8. P. 615–621.
 34. Liu S., Edwards S.D. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals // Bioconjugate Chemistry. 2001. Vol. 12, № 1. P. 7–34.
 35. Pressman D., Korngold L. The in vivo localization of anti-Wagner-osteogenic-sarcoma antibodies // Cancer. 1953. Vol. 6, № 3. P. 619–623.
 36. Csajbók É., Baranyai Z., Bányai I., Brucher E., Király R., Muller-Fahrnow A., Platzek J., Raduchel B., Schäfer M. Equilibrium, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, and

- X-ray diffraction studies on the complexes Bi(DOTA)- and Bi(DO3A-Bu) // *Inorganic Chemistry*. 2003. Vol. 42, № 7. P. 2342–2349.
37. Wadas T.J., Wong E.H., Weisman G.R., Anderson C.J. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease // *Chemical Reviews*. 2010. Vol. 110, № 5. P. 2858–2902.
 38. Liu S., Pietryka J., Ellars C.E., Edwards D.S. Comparison of Yttrium and Indium Complexes of DOTA-BA and DOTA-MBA: Models for ^{90}Y - and ^{111}In -Labeled DOTA–Biomolecule Conjugates // *Bioconjugate Chemistry*. 2002. Vol. 13, № 4. P. 902–913.
 39. Fichna J., Janecka A. Synthesis of Target-Specific Radiolabeled Peptides for Diagnostic Imaging // *Bioconjugate Chemistry*. 2003. Vol. 14, № 1. P. 3–17.
 40. Chappell L.L., Rogers B.E., Khazaeli M.B., Mayo M.S., Buchsbaum D.J., Brechbiel M.W. Improved synthesis of the bifunctional chelating agent 1,4,7,10-tetraaza-N-(1-carboxy-3-(4-nitrophenyl)propyl)-N',N'',N'''-tris(acetic acid)cyclododecane (PA-DOTA) // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1999. Vol. 7, № 11. P. 2313–2320.
 41. Jang Y.H., Blanco M., Dasgupta S., Keire D.A., Shively J.E., Goddard W.A. Mechanism and energetics for complexation of ^{90}Y with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), a model for cancer radioimmunotherapy // *Journal of the American Chemical Society*. 1999. Vol. 121, № 26. P. 6142–6151.
 42. Moreau J., Guillon E., Pierrard J.C., Rimbault J., Port M., Aplincourt M. Complexing mechanism of the lanthanide cations Eu^{3+} , Gd^{3+} , and Tb^{3+} with 1,4,7,10-tetrakis (carboxymethyl)-1,4,7, 10-tetraazacyclododecane (dota) - characterization of three successive complexing phases: Study of the thermodynamic and structural properties // *Chemistry - A European Journal*. 2004. Vol. 10, № 20. P. 5218–5232.
 43. Woodin K.S., Heroux K.J., Boswell C.A., Wong E.H., Weisman G.R., Niu W., Tomellini S.A., Anderson C.J., Zakharov L.N., Rheingold A.L. Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability // *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2005. Vol. 2005, № 23. P. 4829–4833.
 44. Baidoo K.E., Milenic D.E., Brechbiel M.W. Methodology for labeling proteins and peptides with lead-212 (^{212}Pb) // *Nuclear Medicine and Biology*. 2013. Vol. 40, №

5. P. 592–599.
45. Ait-Mohand S., Fournier P., Dumulon-Perreault V., Kiefer G.E., Jurek P., Ferreira C.L., Bénard F., Guérin B. Evaluation of ^{64}Cu -Labeled Bifunctional Chelate–Bombesin Conjugates // *Bioconjugate Chemistry*. 2011. Vol. 22, № 8. P. 1729–1735.
 46. Boswell C.A., Sun X., Niu W., Weisman G.R., Wong E.H., Rheingold A.L., Anderson C.J. Comparative in Vivo Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraazamacrocyclic Complexes // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004. Vol. 47, № 6. P. 1465–1474.
 47. Song H.A., Kang C.S., Baidoo K.E., Milenic D.E., Chen Y., Dai A., Brechbiel M.W., Chong H.-S. An Efficient Bifunctional Decadentate Ligand 3p-C-DEPA for Targeted Alpha Radioimmunotherapy Applications Hyun // *Bioconjugate Chemistry*. 2011. Vol. 15, № 22(6). P. 1128–1135.
 48. Yong K., Brechbiel M.W. Towards translation of ^{212}Pb as a clinical therapeutic; Getting the lead in! // *Dalton Transactions*. 2011. Vol. 40, № 23. P. 6068–6076.
 49. Chappell L.L., Dadachova E., Milenic D.E., Garmestani K., Wu C., Brechbiel M.W. Synthesis, characterization, and evaluation of a novel bifunctional chelating agent for the lead isotopes ^{203}Pb and ^{212}Pb // *Nuclear Medicine and Biology*. 2000. Vol. 27, № 1. P. 93–100.
 50. Müller C., Vlahov I.R., Santhapuram H.K.R., Leamon C.P., Schibli R. Tumor targeting using ^{67}Ga -DOTA-Bz-folate — investigations of methods to improve the tissue distribution of radiofolates // *Nuclear Medicine and Biology*. 2011. Vol. 38, № 5. P. 715–723.
 51. Desai H., Borges-Neto S., Wong T.Z. Molecular Imaging and Therapy for Neuroendocrine Tumors // *Current Treatment Options in Oncology*. 2019. Vol. 20, № 10.
 52. Chen X., Park R., Hou Y., Tohme M., Shahinian A.H., Bading J.R., Conti P.S. microPET and Autoradiographic Imaging of GRP Receptor Expression with ^{64}Cu -DOTA-[Lys3]Bombesin in Human Prostate Adenocarcinoma Xenografts // *Journal of Nuclear Medicine*. 2004. Vol. 45, № 8. P. 1390–1397.
 53. Garrison J.C., Rold T.L., Sieckman G.L., Figueroa S.D., Volkert W.A., Jurisson S.S., Hoffman T.J. In Vivo Evaluation and Small-Animal PET/CT of a Prostate Cancer Mouse Model Using ^{64}Cu Bombesin Analogs: Side-by-Side Comparison of the CB-TE2A and DOTA Chelation Systems // *Journal of Nuclear Medicine*. 2007.

- Vol. 48, № 8. P. 1327–1337.
54. Yapp D.T.T., Ferreira C.L., Gill R.K., Boros E., Wong M.Q., Mandel D., Jurek P., Kiefer G.E. Imaging tumor vasculature noninvasively with positron emission tomography and RGD peptides labeled with copper 64 using the bifunctional chelates DOTA, Oxo-DO3A. And PCTA // *Molecular Imaging*. 2013. Vol. 12, № 4. P. 263–272.
 55. Gholipour N., Jalilian A.R., Fazaeli Y., Sabzevari O., Moradkhani S., Bolourinovin F., Khalaj A. Development of [$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$]-DOTA-rituximab as a possible novel in vivo PET generator for anti-CD20 antigen imaging // *Radiochimica Acta*. 2014. Vol. 102, № 11. P. 1035–1045.
 56. Cordier D., Forrer F., Bruchertseifer F., Morgenstern A., Apostolidis C., Good S., Müller-Brand J., Mäcke H., Reubi J.C., Merlo A. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ^{213}Bi -DOTA-[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]-substance P: a pilot trial // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2010. Vol. 37, № 7. P. 1335–1344.
 57. Kam B.L.R., Teunissen J.J.M., Krenning E.P., de Herder W.W., Khan S., van Vliet E.I., Kwekkeboom D.J. Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012. Vol. 39, № 1. P. 103–112.
 58. Pfeifer A., Knigge U., Mortensen J., Oturai P., Berthelsen A.K., Loft A., Binderup T., Rasmussen P., Elema D., Klausen T.L., Holm S., von Benzon E., Højgaard L., Kjaer A. Clinical PET of Neuroendocrine Tumors Using ^{64}Cu -DOTATATE: First-in-Humans Study // *Journal of Nuclear Medicine*. 2012. Vol. 53, № 8. P. 1207–1215.
 59. Lin M., Welch M.J., Lapi S.E. Effects of Chelator Modifications on ^{68}Ga -Labeled [Tyr³]Octreotide Conjugates // *Molecular Imaging and Biology*. 2013. Vol. 15, № 5. P. 606–613.
 60. Notni J., Pohle K., Wester H.-J. Comparative gallium-68 labeling of TRAP-, NOTA-, and DOTA-peptides: practical consequences for the future of gallium-68-PET // *EJNMMI Research*. 2012. Vol. 2. P. 28.
 61. Kate C.I. te., Fischman A.J., Rubin R.H., Fucello A.J., Riexinger D., Wilkinson R.A., Du L., Khaw B.A., Strauss H.W. Effect of isoelectric point on biodistribution and inflammation imaging with indium-111-labelled IgG // *European Journal of Nuclear Medicine*. 1990. Vol. 17, № 6–8. P. 305–309.

62. Velikyan I., Maecke H., Langstrom B. Convenient Preparation of ^{68}Ga -Based PET-Radiopharmaceuticals at Room Temperature // *Bioconjugate Chemistry*. 2008. Vol. 19, № 2. P. 569–573.
63. Dumont R.A., Deininger F., Haubner R., Maecke H.R., Weber W.A., Fani M. Novel ^{64}Cu - and ^{68}Ga -labeled RGD conjugates show improved PET imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression and facile radiosynthesis // *Journal of Nuclear Medicine*. 2011. Vol. 52, № 8. P. 1276–1284.
64. Bevilacqua A., Gelb R.I., Hebard W.B., Zompa L.J. Equilibrium and Thermodynamic Study of the Aqueous Complexation of 1,4,7-Triazacyclononane- $\text{N},\text{N}',\text{N}''$ -triacetic Acid with Protons, Alkaline-Earth-Metal Cations, And Copper(II) // *Inorganic Chemistry*. 1987. Vol. 26, № 16. P. 2699–2706.
65. Chong H.S., Garmestani K., Ma D., Milenic D.E., Overstreet T., Brechbiel M.W. Synthesis and biological evaluation of novel macrocyclic ligands with pendent donor groups as potential yttrium chelators for radioimmunotherapy with improved complex formation kinetics // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002. Vol. 45, № 16. P. 3458–3464.
66. Ferdani R., Stigers D.J., Fiamengo A.L., Wei L., Li B.T.Y., Golen J.A., Rheingold A.L., Weisman G.R., Wong E.H., Anderson C.J. Synthesis, Cu(II) complexation, ^{64}Cu -labeling and biological evaluation of cross-bridged cyclam chelators with phosphonate pendant arms // *Dalton Transactions*. 2012. Vol. 41, № 7. P. 1938–1950.
67. Dale A. V., Pandya D.N., Kim J.Y., Lee H., Ha Y.S., Bhatt N., Kim J., Seo J.J., Lee W., Kim S.H., Yoon Y.-R., An G. Il, Yoo J. Non-Cross-Bridged Tetraazamacrocyclic Chelator for Stable ^{64}Cu -Based Radiopharmaceuticals // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2013. Vol. 4, № 10. P. 927–931.
68. Lears K.A., Ferdani R., Liang K., Zheleznyak A., Andrews R., Sherman C.D., Achilefu S., Anderson C.J., Rogers B.E. In vitro and in vivo evaluation of ^{64}Cu -labeled SarAr-bombesin analogs in gastrin-releasing peptide receptor-expressing prostate cancer // *Journal of Nuclear Medicine*. 2011. Vol. 52, № 3. P. 470–477.
69. Di Bartolo N., Sargeson A.M., Smith S. V. New ^{64}Cu PET imaging agents for personalised medicine and drug development using the hexa-aza cage, SarAr // *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2006. Vol. 4, № 17. P. 3350–3357.
70. Liu S., Li Z., Yap L.P., Huang C.W., Park R., Conti P.S. Efficient preparation and

- biological evaluation of a novel multivalency bifunctional chelator for ^{64}Cu radiopharmaceuticals // *Chemistry - A European Journal*. 2011. Vol. 17, № 37. P. 10222–10225.
71. Garmestani K., Yao Z., Zhang M., Wong K., Park C.W., Pastan I., Carrasquillo J.A., Brechbiel M.W. Synthesis and evaluation of a macrocyclic bifunctional chelating agent for use with bismuth radionuclides // *Nuclear Medicine and Biology*. 2001. Vol. 28, № 4. P. 409–418.
 72. Chappell L.L., Deal K.A., Dadachova E., Brechbiel M.W. Synthesis, Conjugation, and Radiolabeling of a Novel Bifunctional Chelating Agent for ^{225}Ac Radioimmunotherapy Applications // *Bioconjugate Chemistry*. 2000. Vol. 11, № 4. P. 510–519.
 73. Kodama M., Koike T., Mahatma A.B., Kimura E. Thermodynamic and kinetic studies of lanthanide complexes of 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}''',\text{N}''''$ -pentaacetic acid and 1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecane- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}''',\text{N}'''',\text{N}'''''$ -hexaacetic acid // *Inorganic Chemistry*. 1991. Vol. 30. P. 1270–1273.
 74. Deal K.A., Davis I.A., Mirzadeh S., Kennel S.J., Brechbiel M.W. Improved in vivo stability of actinium-225 macrocyclic complexes // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1999. Vol. 42, № 15. P. 2988–2992.
 75. Granberg D., Sundin A., Janson E.T., Öberg K., Skogseid B., Westlin J.E. Octreoscan in patients with bronchial carcinoid tumours // *Clinical Endocrinology*. 2003. Vol. 59, № 6. P. 793–799.
 76. Reubi J.C., Schär J., Waser B., Wenger S., Heppeler A., Schmitt J.S., Mäcke H.R. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1–SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use // *European Journal of Nuclear Medicine*. 2000. Vol. 27, № 3. P. 273–282.
 77. Buchmann I., Henze M., Engelbrecht S., Eisenhut M., Runz A., Schäfer M., Schilling T., Haufe S., Herrmann T., Haberkorn U. Comparison of ^{68}Ga -DOTATOC PET and ^{111}In -DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2007. Vol. 34, № 10. P. 1617–1626.
 78. Shi W., Johnston C.F., Buchanan K.D., Ferguson W.R., Laird J.D., Crothers J.G., McIlrath E.M. Localization of neuroendocrine tumours with [^{111}In]DTPA-octreotide

- scintigraphy (Octreoscan): A comparative study with CT and MR imaging // QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians. 1998. Vol. 91, № 4. P. 295–301.
79. Camera L., Kinuya S., Garmestani K., Brechbiel M.W., Wu C., Pai L.H., McMurry T.J., Gansow O.A., Pastan I., Paik C.H., Carrasquillo J.A. Comparative biodistribution of indium- and yttrium-labeled B3 monoclonal antibody conjugated to either 2-(p-SCN-Bz)-6-methyl-DTPA (1 B4M-DTPA) or 2-(p-SCN-Bz)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (2B-DOTA) // European Journal of Nuclear Medicine. 1994. Vol. 21, № 7. P. 640–646.
 80. Kozak R.W., Waldmann T.A., Atcher R.W., Gansow O.A. Radionuclide-conjugated monoclonal antibodies: a synthesis of immunology, inorganic chemistry and nuclear science // Trends in Biotechnology. 1986. Vol. 4, № 10. P. 259–264.
 81. Milenic D.E., Roselli M., Mirzadeh S., Pippin C.G., Gansow O.A., Colcher D., Brechbiel M.W., Schlom J. In Vivo evaluation of bismuth-labeled monoclonal antibody comparing DTPA-derived bifunctional chelates // Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 2001. Vol. 16, № 2. P. 133–146.
 82. 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.
 83. Camera L., Kinuya S., Garmestani K., Wu C., Brechbiel M.W., Pai L.H., McMurry T.J., Gansow O.A., Pastan I., Paik C.H., Carrasquillo J.A. Evaluation of the Serum Stability and In Vivo Biodistribution of CHX-DTPA and Other Ligands for Yttrium Labeling of Monoclonal Antibodies // Journal of Nuclear Medicine. 1994. Vol. 35, № 5. P. 882–889.
 84. Boros E., Ferreira C.L., Cawthray J.F., Price E.W., Patrick B.O., Wester D.W., Adam M.J., Orvig C. Acyclic chelate with ideal properties for ^{68}Ga PET imaging agent elaboration // Journal of the American Chemical Society. 2010. Vol. 132, № 44. P. 15726–15733.
 85. Ramogida C.F., Murphy L., Cawthray J.F., Ross J.D., Adam M.J., Orvig C. Novel “bi-modal” H_2dedpa derivatives for radio- and fluorescence imaging // Journal of Inorganic Biochemistry. 2016. Vol. 162. P. 253–262.
 86. Ramogida C.F., Schindler D., Schneider C., Tan Y.L.K., Huh S., Ferreira C.L., Adam M.J., Orvig C. Synthesis and characterization of lipophilic cationic Ga(III) complexes based on the $\text{H}_2\text{CHX dedpa}$ and H_2dedpa ligands and their $^{67/68}\text{Ga}$

- radiolabeling studies // RSC Advances. 2016. Vol. 6, № 105. P. 103763–103773.
87. Ramogida C.F., Boros E., Patrick B.O., Zeisler S.K., Kumlin J., Adam M.J., Schaffer P., Orvig C. Evaluation of H₂CHX dedpa, H₂dedpa- and H₂CHXdedpa-N,N'-propyl-2-NI ligands for ⁶⁴Cu(II) radiopharmaceuticals // Dalton Transactions. 2016. Vol. 45, № 33. P. 13082–13090.
 88. Price E.W., Zeglis B.M., Cawthray J.F., Ramogida C.F., Ramos N., Lewis J.S., Adam M.J., Orvig C. H₄octapa-Trastuzumab: Versatile Acyclic Chelate System for ¹¹¹In and ¹⁷⁷Lu Imaging and Therapy // Journal of the American Chemical Society. 2013. Vol. 135, № 34. P. 12707–12721.
 89. Kang C.S., Sun X., Jia F., Song H.A., Chen Y., Lewis M., Chong H.-S. Synthesis and Preclinical Evaluation of Bifunctional Ligands for Improved Chelation Chemistry of ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu for Targeted Radioimmunotherapy // Bioconjugate Chemistry. 2012. Vol. 23, № 9. P. 1775–1782.
 90. Anderson C.J., Welch M.J. Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging // Chemical Reviews. 1999. Vol. 99, № 9. P. 2219–2234.
 91. Abbas K., Birattari C., Bonardi M., Groppi F., Menapace E., Severgnini M., Shaw D., Stroosnijder M.F. Cyclotron Production of N.C.A. Copper-64 From Deuteron Irradiation on Zinc Target // Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 2001. Vol. 1. P. 67–70.
 92. Gibson N., Simonelli F., Lešetický L., Abbas K., Holzwarth U., Zampese M., Kozempel J. A novel method for n.c.a. ⁶⁴Cu production by the ⁶⁴Zn(d,2p)⁶⁴Cu reaction and dual ion-exchange column chromatography // Radiochimica Acta. 2007. Vol. 95, № 2. P. 75–80.
 93. Obata A., Kasamatsu S., McCarthy D.W., Welch M.J., Saji H., Yonekura Y., Fujibayashi Y. Production of therapeutic quantities of ⁶⁴Cu using a 12 MeV cyclotron // Nuclear Medicine and Biology. 2003. Vol. 30, № 5. P. 535–539.
 94. Rowshanfarzad P., Sabet M., Reza Jalilian A., Kamalidehghan M. An overview of copper radionuclides and production of ⁶¹Cu by proton irradiation of ^{nat}Zn at a medical cyclotron // Applied Radiation and Isotopes. 2006. Vol. 64, № 12. P. 1563–1573.
 95. Gómez F.L.G., Takada Y., Hosoi R., Momosaki S., Yanamoto K., Nagatsu K., Suzuki H., Zhang M.-R., Inoue O., Arano Y., Fukumura T. Production and purification of the positron emitter zinc-63 // Journal of Labelled Compounds and

- Radiopharmaceuticals. 2011. Vol. 55, № 1. P. 5–9.
96. Luccioni G., Cicoria G., Pancaldi D., Malizia C., Marengo M. Effective production of ^{65}Zn with a PET cyclotron // *Applied Radiation and Isotopes*. 2012.
 97. Yagi M., Kondo K. Preparation of carrier-free Zn-69m by $\text{Ga-71}(\gamma, \text{pn})$ reaction // *Radiochemical and Radioanalytical Letters*. 1977. Vol. 30, № 3. P. 173–178.
 98. Mirzadeh S., Mausner L.F., Srivastava S.C. Production of no-carrier added ^{67}Cu // *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes*. 1986. Vol. 37, № 1. P. 29–36.
 99. Sugo Y., Hashimoto K., Kawabata M., Saeki H., Sato S., Tsukada K., Nagai Y. Application of Cu-67 Produced by $\text{Zn-68}(\text{n}, \text{n}'\text{p} + \text{d})\text{Cu-67}$ to Biodistribution Study in Tumor-Bearing Mice // *Journal of the Physical Society of Japan*. 2017. Vol. 86, № 2. P. 3.
 100. Ehrhardt G.J., Ketring A.R., Ayers L.M. Reactor-produced radionuclides at the University of Missouri Research Reactor // *Applied Radiation and Isotopes*. 1998. Vol. 49, № 4. P. 295–297.
 101. Apostolidis C., Molinet R., Rasmussen G., Morgenstern A. Production of Ac-225 from Th-229 for Targeted α Therapy // *Analytical Chemistry*. 2005. Vol. 77, № 19. P. 6288–6291.
 102. Fukumura T., Okada K., Suzuki H., Nakao R., Mukai K., Szelecsényi F., Kovács Z., Suzuki K. An improved $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ generator based on a cation exchanger and its fully remote-controlled preparation for clinical use // *Nuclear Medicine and Biology*. 2006. Vol. 33, № 6. P. 821–827.
 103. Loc'h C., Mazière B., Comar D. A new generator for ionic gallium-68 // *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1980. Vol. 21, № 2. P. 171–173.
 104. Irving H., Williams R.J.P. The Stability of Transition-metal Complexes // *Journal of Chemical Society*. 1953. P. 3192–3210.
 105. Wong T.Z., Lacy J.L., Petry N.A., Hawk T.C., Sporn T.A., Dewhirst M.W., Vlahovic G. PET of Hypoxia and Perfusion with ^{62}Cu -ATSM and ^{62}Cu -PTSM Using a $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ Generator // *American Journal of Roentgenology*. 2008. Vol. 190, № 2. P. 427–432.
 106. Bonardi M.L., Groppi F., Mainardi H.S., Kokhanyuk V.M., Lapshina E. V., Mebel

- M. V., Zhuikov B.L. Cross section studies on ^{64}Cu with zinc target in the proton energy range from 141 down to 31 MeV // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2005. Vol. 264, № 1. P. 101–105.
107. Hilgers K., Stoll T., Skakun Y., Coenen H.H., Qaim S.M. Cross-section measurements of the nuclear reactions $^{\text{nat}}\text{Zn}(\text{d},\text{x})^{64}\text{Cu}$, $^{66}\text{Zn}(\text{d},\alpha)^{64}\text{Cu}$ and $^{68}\text{Zn}(\text{p},\alpha\text{n})^{64}\text{Cu}$ for production of ^{64}Cu and technical developments for small-scale production // *Applied Radiation and Isotopes*. 2003. Vol. 59, № 5–6. P. 343–351.
 108. Szűcs Z., Takács S., Alirezapour B. Development of cost effective method for production of ^{64}Cu from $^{\text{nat}}\text{Ni}$ // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2014. Vol. 302, № 2. P. 1035–1038.
 109. Abbas K., Kozempel J., Bonardi M., Groppi F., Alfarano A., Holzwarth U., Simonelli F., Hofman H., Horstmann W., Menapace E., Lešetický L., Gibson N. Cyclotron production of ^{64}Cu by deuteron irradiation of ^{64}Zn // *Applied Radiation and Isotopes*. 2006. Vol. 64, № 9. P. 1001–1005.
 110. Ohya T., Nagatsu K., Suzuki H., Fukada M., Minegishi K., Hanyu M., Fukumura T., Zhang M.R. Efficient preparation of high-quality ^{64}Cu for routine use // *Nuclear Medicine and Biology*. 2016. Vol. 43, № 11. P. 685–691.
 111. Xie Q., Zhu H., Wang F., Meng X., Ren Q., Xia C., Yang Z. Establishing reliable Cu-64 production process: From target plating to molecular specific tumor micro-PET imaging // *Molecules*. 2017. Vol. 22, № 4.
 112. McCarthy D.W., Shefer R.E., Klinkowstien R.E., Bass L.A., Margeneau W.H., Cutler C.S., Anderson C.J., Welch M.J. Efficient production of high specific activity ^{64}Cu using a biomedical cyclotron // *Nuclear Medicine and Biology*. 1997. Vol. 24, № 1. P. 35–43.
 113. Database of privately and publicly funded clinical studies conducted around the world clinicaltrials.gov [Electronic resource]. URL: <http://clinicaltrials.gov>.
 114. Smith N.A., Bowers D.L., Ehst D.A. The production, separation, and use of ^{67}Cu for radioimmunotherapy: A review // *Applied Radiation and Isotopes*. 2012. Vol. 70, № 10. P. 2377–2383.
 115. Szelecsényi F., Steyn G.F., Dolley S.G., Kovács Z., Vermeulen C., van der Walt T.N. Investigation of the $^{68}\text{Zn}(\text{p}, 2\text{p})^{67}\text{Cu}$ nuclear reaction: New measurements up to 40 MeV and compilation up to 100 MeV // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 2009.

Vol. 267, № 11. P. 1877–1881.

116. Stoll T., Kastleiner S., Shubin Y.N., Coenen H.H., Qaim S.M. Excitation functions of proton induced reactions on ^{68}Zn from threshold up to 71 MeV, with specific reference to the production of ^{67}Cu // *Radiochimica Acta*. 2002. Vol. 90, № 6. P. 309–313.
117. Mikolajczak R., JI P. Reactor Produced Beta-emitting Nuclides for Nuclear Medicine // *World journal of nuclear medicine*. 2005. Vol. 36, № 44. P. 184–190.
118. Howard S., Starovoitova V.N. Target optimization for the photonuclear production of radioisotopes // *Applied Radiation and Isotopes*. 2015. Vol. 96. P. 162–167.
119. Haynes N.G., Lacy J.L., Nayak N., Martin C.S., Dai D., Mathias C.J., Green M.A. Performance of a Zn-62/Cu-62 generator in clinical trials of PET perfusion agent Cu-62-PTSM // *Journal of Nuclear Medicine*. 2000. Vol. 41, № 2. P. 309–314.
120. Aghanejad A., Jalilian A.R., Fazaeli Y., Beiki D., Fateh B., Khalaj A. Radiosynthesis and biodistribution studies of [$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$]-plerixafor complex as a novel in vivo PET generator for chemokine receptor imaging // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2014. Vol. 299, № 3. P. 1635–1644.
121. Williams H.A., Robinson S., Julyan P., Zweit J., Hastings D. A comparison of PET imaging characteristics of various copper radioisotopes // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2005. Vol. 32, № 12. P. 1473–1480.
122. McCarthy D.W. High purity production and potential applications of ^{60}Cu and ^{61}Cu . 1999. Vol. 26, № 98. P. 351–358.
123. Barceloux D.G. Copper // *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 1999. Vol. 37, № 2. P. 217–230.
124. Owen C.A. Distribution of copper in the rat // *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1964. Vol. 207, № 2. P. 446–448.
125. Turnlund J.R. Human whole-body copper metabolism // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1998. Vol. 67, № 5. P. 960S-964S.
126. Fraga C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health // *Molecular Aspects of Medicine*. 2005. Vol. 26, № 4-5 SPEC. ISS. P. 235–244.
127. Rubino J.T., Franz K.J. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012. Vol. 107, № 1. P. 129–143.
128. Kaplan J.H., Maryon E.B. How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but

- Potentially Toxic Metal // Biophysical Journal. 2016. Vol. 110, № 1. P. 7–13.
129. Denoyer D., Masaldan S., La Fontaine S., Cater M.A. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer” // Metallomics. 2015. Vol. 7, № 11. P. 1459–1476.
130. Ishida S., Andreux P., Poitry-Yamate C., Auwerx J., Hanahan D. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013. Vol. 110, № 48. P. 19507–19512.
131. Qin C., Liu H., Chen K., Hu X., Ma X., Lan X., Zhang Y., Cheng Z. Theranostics of Malignant Melanoma with $^{64}\text{CuCl}_2$ // Journal of Nuclear Medicine. 2014. Vol. 55, № 5. P. 812–817.
132. Safi R., Nelson E.R., Chitneni S.K., Franz K.J., George D.J., Zalutsky M.R., McDonnell D.P. Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics // Cancer Research. 2014. Vol. 74, № 20. P. 5819–5831.
133. Chakravarty R., Chakraborty S., Dash A. $^{64}\text{Cu}^{2+}$ Ions as PET Probe: An Emerging Paradigm in Molecular Imaging of Cancer // Molecular Pharmaceutics. 2016. Vol. 13, № 11. P. 3601–3612.
134. Catalogna G., Talarico C., Dattilo V., Gangemi V., Calabria F., D’Antona L., Schenone S., Musumeci F., Bianco C., Perrotti N., Amato R., Cascini G.L. The SGK1 Kinase Inhibitor SI113 Sensitizes Theranostic Effects of the $^{64}\text{CuCl}_2$ in Human Glioblastoma Multiforme Cells // Cellular Physiology and Biochemistry. 2017. Vol. 43, № 1. P. 108–119.
135. Capasso E., Durzu S., Piras S., Zandieh S., Knoll P., Haug A., Hacker M., Meleddu C., Mirzaei S. Role of $^{64}\text{CuCl}_2$ PET/CT in staging of prostate cancer // Annals of Nuclear Medicine. 2015. Vol. 29, № 6. P. 482–488.
136. Boschi A., Martini P., Janevik-Ivanovska E., Duatti A. The emerging role of copper-64 radiopharmaceuticals as cancer theranostics // Drug Discovery Today. 2018. Vol. 23, № 8. P. 1489–1501.
137. Anderson C.J., Dehdashti F., Cutler P.D., Schwarz S.W., Laforest R., Bass L.A., Lewis J.S., McCarthy D.W. as a PET Imaging Agent for Patients with Neuroendocrine Tumors // Journal of Nuclear Medicine. 2000. Vol. 42, № May 2014. P. 213–221.
138. Johnbeck C.B., Knigge U., Loft A., Berthelsen A.K., Mortensen J., Oturai P., Langer S.W., Elema D.R., Kjaer A. Head-to-Head Comparison of ^{64}Cu -DOTATATE and ^{68}Ga -DOTATOC PET/CT: A Prospective Study of 59 Patients with Neuroendocrine

- Tumors // Journal of Nuclear Medicine. 2016. Vol. 58, № 3. P. 451–457.
139. Cai H., Li Z., Huang C.W., Park R., Shahinian A.H., Conti P.S. An improved synthesis and biological evaluation of a new cage-like bifunctional chelator, 4-((8-amino-3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]icosane-1-ylamino)methyl)benzoic acid, for ^{64}Cu radiopharmaceuticals // Nuclear Medicine and Biology. 2010. Vol. 37, № 1. P. 57–65.
 140. Paterson B.M., Roselt P., Denoyer D., Cullinane C., Binns D., Noonan W., Jeffery C.M., Price R.I., White J.M., Hicks R.J., Donnelly P.S. PET imaging of tumours with a ^{64}Cu labeled macrobicyclic cage amine ligand tethered to Tyr 3 -octreotate // Dalton Transactions. 2014. Vol. 43, № 3. P. 1386–1396.
 141. Cantiello F., Gangemi V., Cascini G.L., Calabria F., Moschini M., Ferro M., Musi G., Buttice S., Salonia A., Briganti A., Damiano R. Diagnostic Accuracy of ^{64}Cu Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Primary Lymph Node Staging of Intermediate- to High-risk Prostate Cancer: Our Preliminary Experience // Urology. 2017. Vol. 106. P. 139–145.
 142. Grubmüller B., Baum R.P., Capasso E., Singh A., Ahmadi Y., Knoll P., Floth A., Righi S., Zandieh S., Meleddu C., Shariat S.F., Klingler H.C., Mirzaei S. ^{64}Cu -PSMA-617 PET/CT Imaging of Prostate Adenocarcinoma: First In-Human Studies // Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 2016. Vol. 31, № 8. P. 277–286.
 143. Persson M., Skovgaard D., Brandt-Larsen M., Christensen C., Madsen J., Nielsen C.H., Thurison T., Klausen T.L., Holm S., Loft A., Berthelsen A.K., Ploug M., Pappot H., Brasso K., Kroman N., Højgaard L., Kjaer A. First-in-human uPAR PET: Imaging of cancer aggressiveness // Theranostics. 2015. Vol. 5, № 12. P. 1303–1316.
 144. Lyster D.M., Noujaim A.A. The unit dose preparation of ^{63}Zn -EDTA use in nuclear medicine // International Journal of Nuclear Medicine and Biology. 1974. Vol. 1, № 4. P. 220–223.
 145. Molokhia M., Sturniolo G., Shields R., Turnberg L.A. A simple method for measuring zinc absorption in man using a short-lived isotope ($^{69\text{m}}\text{Zn}$) // The American Journal of Clinical Nutrition. 1980. Vol. 33, № 4. P. 881–886.
 146. Wolterbeek H.T., van der Meer A.J.G.M. Transport rate of arsenic, cadmium, copper and zinc in *Potamogeton pectinatus* L.: radiotracer experiments with ^{76}As , $^{109,115}\text{Cd}$, ^{64}Cu and $^{65,69\text{m}}\text{Zn}$ // Science of The Total Environment. 2002. Vol. 287, № 1. P. 13–

30.

147. Orlova M.A., Trofimova T.P., Aliev R.A., Orlov A.P., Nikulin S. V, Proshin A.N., Kalmykov S.N. ^{69m}Zn -containing radiopharmaceuticals: a novel approach to molecular design // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2017. Vol. 311, № 2. P. 1177–1183.
148. Johnston G.S., Hupf H.B., Gotshall E., Kyle R.W. Zinc-69m Chloride, A New Liver Scanning Agent // *American Journal of Roentgenology Radium Therapy and Nuclear Medicine*. 1967. Vol. 101, № 3. P. 548–550.
149. Lorber S.A., Gold F.M., Maglione A.A., Rubenfel.S. Zm-69m-chloride - a new scanning agent - a study of its dosimetry and biological fate // *Journal of Nuclear Medicine*. 1970. Vol. 11, № 12. P. 699-.
150. Takeda A., Tamano H., Oku N. Alteration of zinc concentrations in the brain implanted with C6 glioma // *Brain Research*. 2003. Vol. 965, № 1. P. 170–173.
151. Kopecký P. Proton beam monitoring via the $\text{Cu}(p,x) \text{ } ^{58}\text{Co}$, $^{63}\text{Cu}(p,2n) \text{ } ^{62}\text{Zn}$ and $^{65}\text{Cu}(p, n) \text{ } ^{65}\text{Zn}$ reactions in copper // *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 2002. Vol. 36, № 8. P. 657–661.
152. Bruandet J.F., Chan T.U., Agard M., Longequeue J.P., Morand C., Giorni A., Nuclaires I.S., Cedex G. A In Beam Gamma Spectroscopy of ^{62}Zn // *Zeitschrift fQr Physik A*. 1976. Vol. 77. P. 69–77.
153. Szelecsényi F., Kovács Z., Van Der Walt T.N., Steyn G.F., Suzuki K., Okada K. Investigation of the $^{\text{nat}}\text{Zn}(p,x)^{62}\text{Zn}$ nuclear process up to 70 MeV: A new $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ generator // *Applied Radiation and Isotopes*. 2003. Vol. 58, № 3. P. 377–384.
154. Fujibayashi Y., Saji H., Yomoda I., Suzuki K.H., Torizuka K., Yokoyama A. A new approach toward a pancreas-seeking zinc radiopharmaceutical - I. Accumulation of ^{65}Zn -amino acid and aminopolycarboxylic acid complexes in pancreatic tissue slices // *European Journal of Nuclear Medicine*. 1986. Vol. 11, № 12. P. 484–487.
155. Buxani-Rice S., Ueda F., Bradbury M.W.B. Transport of Zinc-65 at the Blood-Brain Barrier During Short Cerebrovascular Perfusion in the Rat: Its Enhancement by Histidine // *Journal of Neurochemistry*. 1994. Vol. 62, № 2. P. 665–672.
156. Takeda A., Tamano H., Ohnuma M., Okada S. Zn-65 uptake by liver of rats fed 3'-methyl-dimethylaminoazobenzene // *Nuclear Medicine and Biology*. 1995. Vol. 22, № 3. P. 351–353.
157. Kumar A., Nair P., Malhotra A., Majumdar S., Garg M.L., Dhawan D.K. Altered

- uptake and biological half-lives of ^{65}Zn on arsenic exposure - Modulation by zinc treatment // *Biological Trace Element Research*. 2011. Vol. 144, № 1–3. P. 1059–1068.
158. Bunyan K.E., Blindauer C.A., Sadler P.J., Berezenko S., Harrison D.J., Stewart A.J., Harvey I., Sleep D. Structure, Properties, and Engineering of the Major Zinc Binding Site on Human Albumin // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284, № 34. P. 23116–23124.
 159. Tapiero H., Tew K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003. Vol. 57, № 9. P. 399–411.
 160. Williams R.J.P. The Biochemistry of Zinc // *Polyhedron*. 1987. Vol. 6, № 1. P. 61–69.
 161. Aamodt R.L., Rumble W.F., Johnston G.S., Foster D., Henkin R.I. Zinc metabolism in humans after oral and intravenous administration of Zn-69m // *American Journal of Clinical Nutrition*. 1979. Vol. 32, № 3. P. 559–569.
 162. Engels L., Vandenhamer C.J.A., Buys W.C.A., Vantongerren J.H.M. Metabolism of orally-administered Zn-69m in patients with short bowel syndrome as compared to control subjects // *Trace Elements in Medicine*. 1987. Vol. 4, № 2. P. 67–71.
 163. Foster D.M., Wastney M.E., Henkin R.I. Zinc metabolism in humans: a kinetic model // *Mathematical Biosciences*. 1984. Vol. 72, № 2. P. 359–372.
 164. Fujibayashi Y., Saji H., Yomoda I., Kawai K., Horiuchi K., Adachi H., Torizuka K., Yokoyama A. ^{62}Zn -EDDA: A radiopharmaceutical for pancreatic functional diagnosis // *International Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 1986. Vol. 12, № 6. P. 439–446.
 165. DeGrado T.R., Kemp B.J., Pandey M.K., Jiang H., Gunderson T.M., Linscheid L.R., Woodwick A.R., McConnell D.M., Fletcher J.G., Johnson G.B., Petersen R.C., Knopman D.S., Lowe V.J. First PET imaging studies with ^{63}Zn -zinc citrate in healthy human participants and patients with Alzheimer disease // *Molecular Imaging*. 2016. Vol. 15. P. 1–10.
 166. Rosenblat T.L., McDevitt M.R., Mulford D.A., Pandit-Taskar N., Divgi C.R., Panageas K.S., Heaney M.L., Chanel S., Morgenstern A., Sgouros G., Larson S.M., Scheinberg D.A., Jurcic J.G. Sequential Cytarabine and α -Particle Immunotherapy with Bismuth-213–Lintuzumab (HuM195) for Acute Myeloid Leukemia // *Clinical*

- Cancer Research. 2010. Vol. 16, № 21. P. 5303–5311.
167. McDevitt M.R., Finn R.D., Ma D., Larson S.M., Scheinberg D.A. Preparation of α -emitting ^{213}Bi -labeled antibody constructs for clinical use // Journal of Nuclear Medicine. 1999. Vol. 40, № 10. P. 1722–1727.
 168. Nikula T.K., McDevitt M.R., Finn R.D., Wu C., Kozak R.W., Garmestani K., Brechbiel M.W., Curcio M.J., Pippin C.G., Tiffany-Jones L., Geerlings M.W., Apostolidis C., Molinet R., Geerlings M.W., Gansow O.A., Scheinberg D.A. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: Pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry // Journal of Nuclear Medicine. 1999. Vol. 40, № 1. P. 166–176.
 169. Sathekge M., Knoesen O., Meckel M., Modiselle M., Vorster M., Marx S. ^{213}Bi -PSMA-617 targeted alpha-radionuclide therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2017. Vol. 44, № 6. P. 1099–1100.
 170. Kratochwil C., Giesel F.L., Bruchertseifer F., Mier W., Apostolidis C., Boll R., Murphy K., Haberkorn U., Morgenstern A. ^{213}Bi -DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2014. Vol. 41, № 11. P. 2106–2119.
 171. JANIS nuclear database [Electronic resource]. URL: <http://www.oecd-neo.org/janisweb/>.
 172. 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.
 173. Puigdomenech I. Hydrochemical Equilibrium Constant Database (HYDRA) and MEDUSA (Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms) Programs. Sweden: Royal Institute of Technology, 1997.
 174. Russell W.M.S., Burch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen, 1959.
 175. Torres S., Martins J.A., André J.P., Neves M., Santos A.C., Prata M.I.M., Geraldés C.F.G.C. Radiolabeled ^{153}Sm -chelates of glycoconjugates: Multivalence and topology effects on the targeting of the asialoglycoprotein receptor // Radiochimica

- Acta. 2007. Vol. 95, № 6. P. 343–349.
176. Lee H.B., Blafox M.D. Blood Volume in the Rat // *Journal of Nuclear Medicine*. 1985. Vol. 25. P. 72–76.
 177. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Academies Press. 2010. 1–246 p.
 178. Koprda V., Fojtik M., Szlaurova M. Anion Exchange in Mixed Solvent Systems. I. Study of the Equilibrium Distribution // *Chemické zvesti*. 1972. Vol. 26. P. 482–493.
 179. Yagi M., Kondo K. Preparation of carrier-free ^{67}Cu by the $^{68}\text{Zn}(\gamma, p)$ reaction // *The International Journal Of Applied Radiation And Isotopes*. 1978. Vol. 29, № 12. P. 757–759.
 180. Martell A.E., Smith R.M. Critical Stability Constants. Volume 6. Second Supplement. New York: Springer Science + Business Media, 1989.
 181. 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.
 182. Holloway J.H., Reilley C.N. Metal Chelate Stability Constants of Aminopolycarboxylate Ligands // *Analytical Chemistry*. 1960. Vol. 32, № 2. P. 249–256.
 183. Martell A.E., Hancock R.D. Metal Complexes in Aqueous Solutions. New York: Springer Science + Business Media, 1996.
 184. Parr R.G., Pearson R.G. Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity // *Journal of the American Chemical Society*. 1983. Vol. 105, № 26. P. 7512–7516.
 185. 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.
 186. Erten H N., Mohammed A.K., Choppin G.R. Variation of Stability Constants of Thorium and Uranium Oxalate Complexes with Ionic Strength // *Radiochimica Acta*. 1994. Vol. 66–67, № s1. P. 123.
 187. 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.
188. 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.
 189. Thiele N.A., Brown V., Kelly J.M., Amor-Coarasa A., Jermilova U., MacMillan S.N., Nikolopoulou A., Ponnala S., Ramogida C.F., Robertson A.K.H., Rodríguez-Rodríguez C., Schaffer P., Williams C., Babich J.W., Radchenko V., Wilson J.J. An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy // *Angewandte Chemie - International Edition*. 2017. Vol. 56, № 46. P. 14712–14717.
 190. Lázár I., Király R., Takács Z. Synthesis, potentiometric and ^1H NMR study of protonation and complex formation of 1,4,7-triazacyclononane-1,4-diacetate // *Journal of Coordination Chemistry*. 2000. Vol. 51, № 3. P. 293–304.
 191. Roger M., Lima L.M.P., Frindel M., Platas-Iglesias C., Gestin J.F., Delgado R., Patinec V., Tripier R. Monopicolinate-dipicolyl derivative of triazacyclononane for stable complexation of Cu^{2+} and $^{64}\text{Cu}^{2+}$ // *Inorganic Chemistry*. 2013. Vol. 52, № 9. P. 5246–5259.
 192. Markowski W., Soczewiński E. Computer-aided optimization of gradient multipledevelopment thin-layer chromatography. I. Two-stage development // *Journal of Chromatography A*. 1992. Vol. 623, № 1. P. 139–147.
 193. Watanabe S., Hashimoto K., Ishioka N.S. Lutetium-177 complexation of DOTA and DTPA in the presence of competing metals // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2015. Vol. 303, № 2. P. 1519–1521.
 194. Marcus Y. Ionic radii in aqueous solutions // *Chemical Reviews*. 1988. Vol. 88, № 8. P. 1475–1498.
 195. Lukas G., Brindle S.D., Greengard P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1971. Vol. 178, № 3. P. 562 LP – 566.
 196. Cooper M.S., Ma M.T., Sunassee K., Shaw K.P., Williams J.D., Paul R.L., Donnelly P.S., Blower P.J. Comparison of ^{64}Cu -Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo Stability // *Bioconjugate Chemistry*. 2012. Vol. 23. P. 1029–1039.

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.

Также автор признателен Л.С. Замуруевой и С.Ю. Хабировой за неоценимую помощь в проведении отдельных экспериментов.

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

Приложения

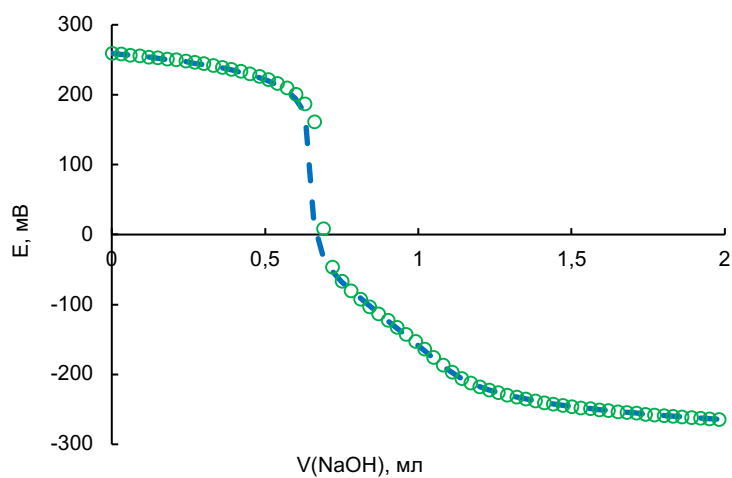


Рисунок П1. Кривая титрования лиганда L1 ($c(L1) = 1 \cdot 10^{-3} M$)

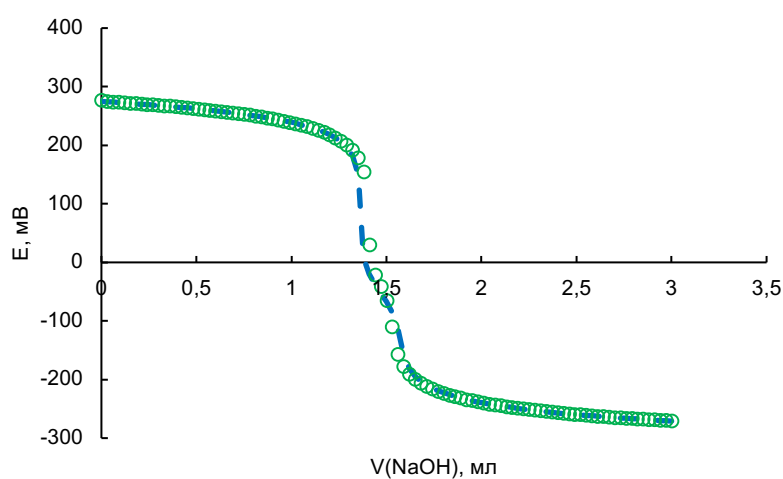


Рисунок П2. Кривая титрования лиганда L2 ($c(L1) = 1 \cdot 10^{-3} M$)

Таблица П1. Константы устойчивости комплексов лиганда L1 с катионами Cu^{2+} и гидроксокомплексов Cu^{2+} в водном растворе ($\mu=0.1 M$) при $25^\circ C$.

L	Cu^{2+}	H^+	$lg\beta$	Равновесие
1	1	0	$15,6 \pm 0,1$	$(L1) + Cu^{2+} \rightleftharpoons (L1) \cdot (Cu^{2+})$
1	1	-1	$9,2 \pm 0,1$	$(L1) + Cu^{2+} + H_2O \rightleftharpoons (L1) \cdot (Cu^{2+}) \cdot (OH^-) + H^+$

L	Cu ²⁺	H ⁺	lgβ	Равновесие
1	1	-2	-0,8±0,1	(L1)+Cu ²⁺ +2H ₂ O ⇌ (L1)·(Cu ²⁺)·(OH ⁻) ₂ +2H ⁺
0	1	-1	-7,96 [173]	Cu ²⁺ +H ₂ O ⇌ (CuOH) ⁺ +H ⁺
0	1	-2	-16,24 [173]	Cu ²⁺ +2H ₂ O ⇌ Cu(OH) ₂ +2H ⁺
0	1	-3	-26,7 [173]	Cu ²⁺ +3H ₂ O ⇌ Cu(OH) ₃ ⁻ +3H ⁺
0	1	-4	-39,6 [173]	Cu ²⁺ +4H ₂ O ⇌ (Cu(OH) ₄) ²⁻ +4H ⁺
0	2	-1	-6,7 [173]	2Cu ²⁺ +H ₂ O ⇌ (Cu ₂ OH) ³⁺ +H ⁺
0	2	-2	-10,35 [173]	2Cu ²⁺ +H ₂ O ⇌ (Cu ₂ (OH) ₂) ²⁺ +2H ⁺
0	3	-4	-21,1 [173]	3Cu ²⁺ +4H ₂ O ⇌ (Cu ₃ (OH) ₄) ²⁺ +4H ⁺

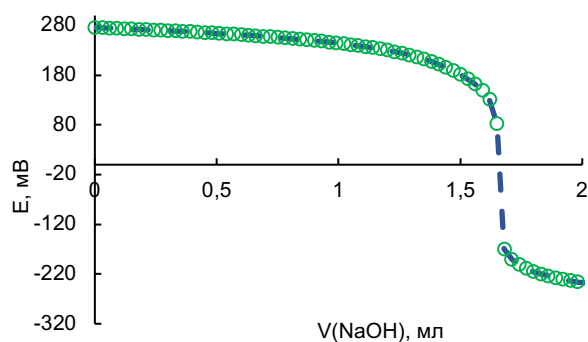


Рисунок ПЗ. Кривая титрования лиганда L1 в присутствии катионов Cu²⁺

Таблица П2. Константы устойчивости комплексов лиганда L2 с катионами Cu²⁺ и гидроксокомплексов Cu²⁺ в водном растворе (μ=0.1 M) при 25°C.

L2	Cu ²⁺	H ⁺	lgβ	Равновесие
1	1	0	16,8±0,1	(L2)+Cu ²⁺ ⇌ (L2)·(Cu ²⁺)
1	1	1	20,5±0,1	(L2)+Cu ²⁺ +H ⁺ ⇌ (L2)·(Cu ²⁺)·(H ⁺)
0	1	-1	-7,96 [173]	Cu ²⁺ +H ₂ O ⇌ (CuOH) ⁺ +H ⁺
0	1	-2	-16,24 [173]	Cu ²⁺ +2H ₂ O ⇌ Cu(OH) ₂ +2H ⁺
0	1	-3	-26,7 [173]	Cu ²⁺ +3H ₂ O ⇌ Cu(OH) ₃ ⁻ +3H ⁺
0	1	-4	-39,6 [173]	Cu ²⁺ +4H ₂ O ⇌ (Cu(OH) ₄) ²⁻ +4H ⁺
0	2	-1	-6,7 [173]	2Cu ²⁺ +H ₂ O ⇌ (Cu ₂ OH) ³⁺ +H ⁺
0	2	-2	-10,35 [173]	2Cu ²⁺ +H ₂ O ⇌ (Cu ₂ (OH) ₂) ²⁺ +2H ⁺
0	3	-4	-21,1 [173]	3Cu ²⁺ +4H ₂ O ⇌ (Cu ₃ (OH) ₄) ²⁺ +4H ⁺

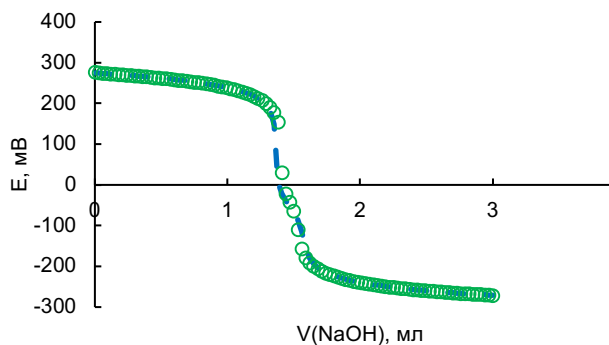


Рисунок П4. Кривая титрования лиганда L2 в присутствии катионов Cu^{2+}

Таблица П3. Константы устойчивости комплексов лиганда L1 с катионами Zn^{2+} и гидроксокомплексов Zn^{2+} в водном растворе ($\mu=0.1 \text{ M}$) при 25°C .

L	Zn^{2+}	H^+	$\lg\beta$	Равновесие
1	1	0	$8,8 \pm 0,1$	$(\text{L1}) + \text{Zn}^{2+} \rightleftharpoons (\text{L1}) \cdot (\text{Zn}^{2+})$
1	1	-1	$0,7 \pm 0,2$	$(\text{L1}) + \text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{L1}) \cdot (\text{Zn}^{2+}) \cdot (\text{OH}^-) + \text{H}^+$
1	1	-2	$-9,8 \pm 0,2$	$(\text{L1}) + \text{Zn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{L1}) \cdot (\text{Zn}^{2+}) \cdot (\text{OH}^-)_2 + 2\text{H}^+$
0	1	-1	$-7,5 [173]$	$\text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{ZnOH})^+ + \text{H}^+$
0	1	-2	$-16,4 [173]$	$\text{Zn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+$
0	1	-3	$-28,2 [173]$	$\text{Zn}^{2+} + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}(\text{OH})_3^- + 3\text{H}^+$
0	1	-4	$-41,3 [173]$	$\text{Zn}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{Zn}(\text{OH})_4)^{2-} + 4\text{H}^+$
0	2	-1	$-9,0 [173]$	$2\text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{Zn}_2\text{OH})^{3+} + \text{H}^+$
0	2	-2	$-27,0 [173]$	$2\text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{Zn}_4(\text{OH})_4)^{2+} + 2\text{H}^+$
0	3	-4	$-54,3 [173]$	$2\text{Zn}^{2+} + 6\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{Zn}_2(\text{OH})_6)^{2+} + 4\text{H}^+$

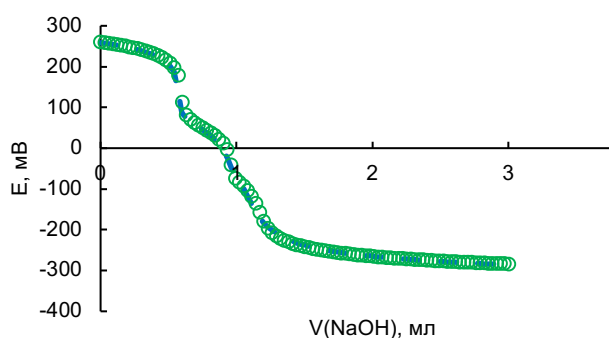


Рисунок П5. Кривая титрования лиганда L1 в присутствии катионов Zn^{2+}

Таблица П4. Константы устойчивости комплексов лиганда L2 с катионами Zn^{2+} и гидроксокомплексов Zn^{2+} в водном растворе ($\mu=0.1$ M) при 25°C.

L	Zn^{2+}	H^+	$lg\beta$	Равновесие
1	1	1	$3,6\pm 0,1$	$(L2)+Zn^{2+}+H^+ \rightleftharpoons (L2H)\cdot(Zn^{2+})$
1	1	0	$14,9\pm 0,1$	$(L2)+Zn^{2+} \rightleftharpoons (L2)\cdot(Zn^{2+})$
1	1	-1	$19,0\pm 0,1$	$(L2)+Zn^{2+}+2H_2O \rightleftharpoons (L2)\cdot(Zn^{2+})\cdot(OH^-)+2H^+$
0	1	-1	$-7,5 [173]$	$Zn^++H_2O \rightleftharpoons (ZnOH)^++H^+$
0	1	-2	$-16,4 [173]$	$Zn^{2+}+2H_2O \rightleftharpoons Zn(OH)_2+2H^+$
0	1	-3	$-28,2 [173]$	$Zn^{2+}+3H_2O \rightleftharpoons Zn(OH)_3^-+3H^+$
0	1	-4	$-41,3 [173]$	$Zn^{2+}+4H_2O \rightleftharpoons (Zn(OH)_4)^{2-}+4H^+$
0	2	-1	$-9,0 [173]$	$2Zn^{2+}+H_2O \rightleftharpoons (Zn_2OH)^{3+}+H^+$
0	2	-2	$-27,0 [173]$	$2Zn^{2+}+H_2O \rightleftharpoons (Zn_4(OH)_4)^{2+}+2H^+$
0	3	-4	$-54,3 [173]$	$2Zn^{2+}+6H_2O \rightleftharpoons (Zn_2(OH)_6)^{2+}+4H^+$

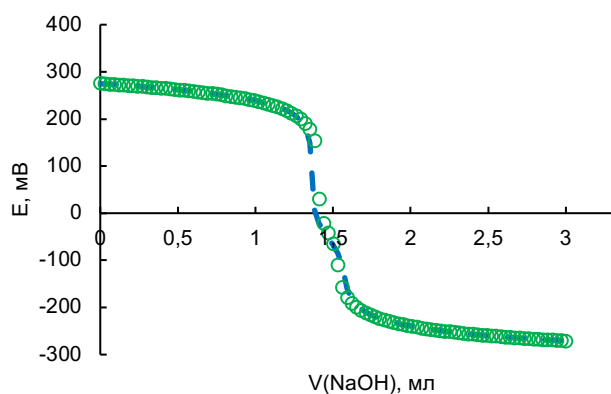


Рисунок П6. Кривая титрования лиганда L2 в присутствии катионов Zn^{2+}

Таблица П5. Распределение меченных препаратов цинка в организме лабораторной мыши через 1 и 6 часов (%в.д./г)

Орган/ткань/ биологическая жидкость	Zn blank		ZnL3		ZnL2	
	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч
печень	$7,45\pm 1,31$	$11,12\pm 0,8$	$2,72\pm 0,32$	$0,98\pm 0,38$	$3,22\pm 0,16$	$3,31\pm 1,01$
почки	$3,54\pm 0,56$	$8,1\pm 0,91$	$3,76\pm 0,64$	$1,14\pm 0,56$	$6,01\pm 1,13$	$2,58\pm 1,4$

Орган/ткань/ биологическая жидкость	Zn blank		ZnL3		ZnL2	
	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч
поджелудочная	11,71±1,24	13,56±3,54	1,06±0,71	0,57±0,29	4,32±0,98	3,04±1,9
селезенка	7,66±1,59	5,35±0,5	0,41±0,16	0,36±0,11	2,32±0,19	1,69±0,94
легкие	0,68±0,17	3,75±2,11	0,46±0,05	0,18±0,06	1,42±0,02	0,97±0,65
сердце	0,38±0,08	2,7±1,03	0,26±0,04	0,12±0,06	0,78±0,04	0,38±0,33
мозг	0,13±0,03	0,62±0,24	0,09±0,03	0,04±0,03	0,22±0,02	0,07±0,13
бедренная кость	1,26±0,88	5,59±0,52	0,7±0,02	0,47±0,4	1,18±0,36	1,2±1,04
кровь	0,28±0,02	0,33	0,42±0,27	0,03±0,01	0,54±0,09	0,05±0,09
моча	27,96	20,13	286±153	152±23	439±339	71
остальное тело	1,78±0,22	2,47±1,1	0,94±0,13	0,4±0,17	1,09±0,09	1±0,13

Таблица П6. Распределение препаратов ^{207}Bi в организме лабораторной мыши (%в.д./г)

Орган	BiEDTA		BiL2		BiL3	
	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч
печень	6,2±2,3	2,34±0,76	2,97±0,42	1,64±0,29	1,53±0,48	0,92±0,12
почки	45,0±1,3	17,6±3,2	34,4±3,3	29,6±3,0	12,2±6,1	6,0±1,4
селезенка	0,20±0,08	0,142±0,012	1,18±0,34	0,89±0,31	0,07±0,02	0,034±0,018
легкие	0,3±0,1	0,149±0,002	0,64±0,19	0,56±0,14	0,13±0,04	0,054±0,004

Орган	BiEDTA		BiL2		BiL3	
	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч
сердце	$0,09 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,17$	$0,06 \pm 0,04$	$0,019 \pm 0,005$
мозг	$0,020 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,005$	$0,05 \pm 0,01$	$0,3 \pm 0,43$	$0,009 \pm 0,002$	$0,004 \pm 0,001$