

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Замуруева Любовь Сергеевна

**Комплексные соединения радионуклидов меди и свинца с азакраун
эфирами**

1.4.13 Радиохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

с.н.с., к.х.н. Егорова Б.В.

Москва – 2024

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
1. Обзор литературы.....	12
1.1 Соединения меди в ядерной медицине.....	12
1.1.1 Роль меди в организме.....	12
1.1.2 Медицинские изотопы меди.....	13
1.1.3 Хелаторы для меди.....	16
1.1.4 Клинические исследования с изотопами меди.....	20
1.2 Соединения свинца в ядерной медицине.....	27
1.2.1 Роль свинца в организме и медицинские изотопы свинца.....	27
1.2.2 Хелаторы для свинца.....	29
1.1.3 Клинические исследования с изотопами свинца.....	34
1.3 15-краун-5 и 18-краун-6 эфиры как хелаторы различных катионов для ядерной медицины.....	38
1.4 Выводы из обзора литературы.....	42
2. Экспериментальная часть.....	44
2.1 Оборудование и реактивы.....	44
2.2 Потенциометрическое и спектрофотометрическое титрование.....	44
2.3 Выделение радионуклидов.....	45
2.4 Получение и анализ меченых соединений.....	46
2.5 Устойчивость в биологически значимых средах.....	47
2.6 Определение структуры комплексов с помощью теоретического (расчетного) метода функционала плотности.....	48
2.7 Спектроскопия протяжённой тонкой структуры рентгеновского поглощения (EXAFS).....	49

2.8	Определение потенциала восстановления меди в комплексе	49
2.9	Определение липофильности комплексов.....	50
2.10	Биораспределение в организме мышей	50
3.	Результаты и обсуждение.....	52
3.1	Константы протонирования лигандов	52
3.2	Константы устойчивости комплексов меди	56
3.3	Константы устойчивости комплексов свинца	62
3.4	Определение условий образования меченых комплексов.....	66
3.5	Оценка стабильности комплексов <i>in vitro</i>	71
3.5.1	Исследование стабильности комплексов меди.....	71
3.5.2	Исследование структуры комплексов меди.....	74
3.5.3	Окислительно-восстановительное поведение Cu^{2+} в составе комплекса с L2d.....	79
3.5.4	Исследование стабильности комплексов свинца.....	81
3.5.5	Липофильность комплексов меди и свинца.....	84
3.6	Оценка стабильности комплексов <i>in vivo</i>	85
3.6.1	Биораспределение комплекса $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{CuL2d}$	85
3.6.2	Биораспределение комплекса $[\text{}^{210}\text{Pb}]\text{PbL2d}$	89
3.6.3	Биораспределение комплекса $[\text{}^{210}\text{Pb}]\text{PbL1d}$	90
	Заключение	93
	Выводы.....	94
	Список литературы.....	95

Список сокращений

- ВАРТА – 1,2-Бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота
- ДОТА – 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота
- ДОТР – 1,4,7,10-Тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраилтетракис(метилфосфоновая кислота)
- масгора – дипиколинат диаза-18-краун-6
- НОТА – 1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислота
- SAR – саркофагин, 3,6,10,13,16,19-гексазабицикло[6.6.6]икозан
- ТСМС (ДОТАМ) – S-2-(4-изотиоцианато-бензил)-1,4,7,10-тетрааза-1,4,7,10-тетра(2-карбамо-илметил) циклододекан
- ТЕТА – 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота
- КЧ – координационное число
- ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография
- Принцип ЖМКО – принцип жёстких и мягких кислот и оснований
- ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография
- РПЖ – рак предстательной железы
- РФП – радиофармацевтический препарат
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТСХ – тонкослойная хроматография

Введение

Ядерная медицина связана с применением радиофармпрепаратов – препаратов, которые содержат один или несколько радиоактивных изотопов. Эти препараты могут быть использованы для диагностики и терапии заболеваний в зависимости от типа излучения: радиофармпрепараты диагностического назначения содержат γ - или β^+ -эмиттеры, излучение которого проникает за пределы организма и регистрируется внешними детекторами. Радионуклиды, используемые в терапии, распадаются с испусканием β^- , α -частиц, Оже-электронов, а также электронов внутренней конверсии.

Среди изотопов меди в настоящее время наибольший интерес с точки зрения ядерной медицины представляют ^{64}Cu и ^{67}Cu , которые могут использоваться как тераностические, сочетающие возможности терапии и диагностики. При таком подходе можно использовать соединения одинакового состава с варьированием изотопов одного элемента, что не будет менять химических свойств вещества и позволит не только контролировать процесс лечения, но и предварительно оценивать возможность терапии, а также дозовую нагрузку.

В последние годы в области ядерной медицины растет интерес к альфа-излучающим радионуклидам. Было показано, что их воздействие на опухолевые ткани эффективнее за счет меньшего пробега в тканях и большей линейной передачи энергии α -частиц, чем у β^- . Известно лишь небольшое количество изотопов с подходящими для медицинского применения характеристиками, среди них ^{211}At , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac и ^{227}Th . При этом ^{212}Pb не является альфа-излучателем, а распадается путем бета-излучения до ^{212}Bi , который испускает альфа- и бета-частицы. Поэтому в данном случае изотоп свинца интересен как материнский радионуклид для изотопа висмута, который будет образовываться *in situ* при введении в организм, т.н. *in vivo* генератор $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$. Среди изотопов свинца есть диагностический изотоп – ^{203}Pb , который распадается в результате электронного захвата, высвобождая

фотон с энергией 279 кэВ, что делает возможным его использование в однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ). Сочетание двух изотопов свинца также может быть использовано в тераностике.

Большая часть перспективных и используемых РФП содержит радиоактивные изотопы металла. Такие препараты зачастую состоят из радионуклида и молекулы-носителя с высокой способностью специфического связывания с тканью или встраивания в метаболические процессы организма. Радионуклиды связаны с биологическими молекулами через комплекс с органическими лигандами – хелаторами. Хелаторы, используемые в ядерной медицине, можно разделить на 2 основных вида: циклические и ациклические. Первые, как правило, образуют устойчивые комплексы с катионами, но для связывания с радионуклидом требуют нагревания или продолжительного времени. Ациклические же, наоборот, быстро связывают радионуклид, но зачастую образуемые комплексы уступают в устойчивости комплексам с циклическими хелаторами. Поиск хелаторов, эффективно и быстро связывающих катионы радионуклидов медицинского назначения, остается важной задачей исследований. Для связывания изотопов меди и свинца с биологическими молекулами в настоящее время используются макроциклические хелаторы, причем для свинца известен только один эффективный хелатор. Азакраун-эфиры образуют устойчивые комплексы со многими металлами за счет большого количества неподеленных электронных пар, ориентированных внутрь цикла, куда включаются катионы металлов. Азакраун-эфиры с большими размерами макроцикла (18-краун-6) в настоящее время интенсивно исследуются для катионов ряда лантаноидов, висмута, радия и актиния, при этом для меди и свинца исследованы только хелаторы с меньшим размером. В данной работе изучается ряд азакраун-эфиров с размером макроцикла 15(18)-краун-5(6) с различными донорными группами (рис. 1).

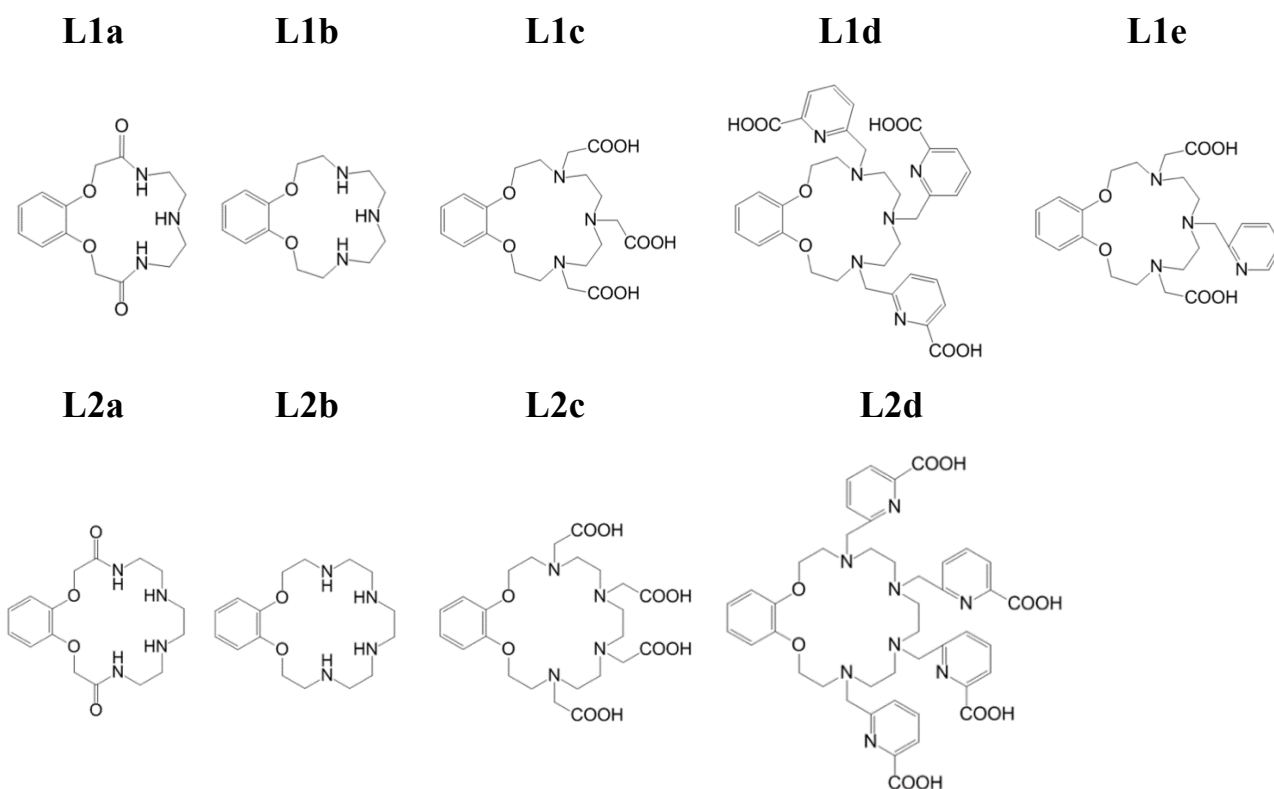


Рис. 1. Лиганды, исследуемые в данной работе.

Целью данной работы был поиск эффективных лигандов для радионуклидов медицинского назначения ($^{64,67}\text{Cu}$, $^{203,212}\text{Pb}$) на основе 15(18)-бензоазакраун-5(6)-эфиров и установление закономерностей образования соответствующих комплексов.

В рамках работы решались следующие задачи:

1. Определение констант протонирования лигандов;
2. Определение констант устойчивости комплексов Cu^{2+} и Pb^{2+} с лигандами методом потенциометрического титрования;
3. Получение и анализ радиохимической чистоты комплексов с радионуклидами Cu^{2+} и Pb^{2+} ;
4. Оценка стабильности комплексов *in vitro*: в среде конкурентных ионов (в т.ч. биологически значимых) и сыворотки крови;
5. Исследование биораспределения наиболее устойчивых *in vitro* комплексов Cu^{2+} и Pb^{2+} *in vivo*: в организме здоровых мышей.

Научная новизна работы.

1. Впервые показано, что 15(18)-краун-5(6) эфиры, комбинируя в себе свойства известных макроциклических и ациклических лигандов, могут эффективно связывать как крупные катионы Pb^{2+} , так и Cu^{2+} ;

2. Наиболее эффективное связывание катионов меди осуществляется лигандами, в которых дополнительные хелатирующие группы содержат пиколиновые и пиридиновые атомы азота. С тетрапиколиновым лигандом достигается наибольшая устойчивость, несмотря на отсутствие координации внутри макроцикла. Наиболее прочные комплексы с катионами свинца образуют тетраацетатный 18-краун-6 и трипиколиноватный 15-краун-5 эфиры.

Положения, выносимые на защиту.

1. Наличие большой краун-эфирной полости в 15(18)-азакраун-5(6) делает возможным образование би- и моноядерных комплексов с небольшими катионами Cu^{2+} и более крупными – Pb^{2+} .

2. Комплексы тетрапиколиноватного лиганда (L2d) с Cu^{2+} , трипиколиноватного (L1d) и тетраацетатного (L2c) с Pb^{2+} сопоставимы с используемыми в радиофармпрепаратах по значениям констант комплексообразования, устойчивости *in vitro* и при этом существенно быстрее образуются при комнатной температуре за ≤ 2 минуты.

3. Комплексы тетраацетатного и трипиколиноватного лигандов с Pb^{2+} характеризуются высокой инертностью в условиях *in vivo*, поскольку, в отличие от несвязанного катиона, не задерживаются в организме здоровых мышей.

Теоретическая и практическая значимость работы.

1. Показано, что на основе 18(15)-азакраун-6(5) макроцикла варьированием заместителей можно связывать катионы разного размера, при этом образование комплексов происходит без нагревания, а образуемые комплексы показывают стабильность, в т.ч. *in vivo*. Сочетание свойств

ациклических и макроциклических лигандов делает возможным быстрое образование инертных комплексов, что достигается за счет бóльшего размера относительно предлагаемых в настоящее время хелаторов Cu^{2+} и Pb^{2+} для применения в РФП.

2. Комплексообразующие свойства тетраацетатного и трипиколинатного лигандов делают возможным их использование не только с ^{203}Pb , но и с *in vivo* генератором $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ в составе диагностических и терапевтических РФП, соответственно.

Методология и методы исследования.

В работе использовались современные инструментальные методы анализа: потенциометрическое титрование, спектрофотометрия, гамма-спектрометрия, цифровая автордиография, тонкослойная хроматография. Часть исследования выполнялась с помощью теоретического (расчетного) метода функционала плотности.

Соответствие паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.13 – Радиохимия по области исследований: методы выделения, разделения и очистки радиоактивных элементов и изотопов; получение и идентификация меченых соединений; методы радиохимического анализа; автордиография; химические аспекты использования радионуклидов в биологии и медицине.

Степень достоверности.

Достоверность результатов определяется использованием современных инструментальных методов и подтверждается высокой сходимостью параллельных исследований и воспроизводимостью полученных результатов.

Личный вклад автора состоит в критическом обзоре литературных данных; потенциометрическом титровании новых лигандов и их комплексов с катионами меди и свинца; определении констант устойчивости комплексов; подборе условий получения комплексов радионуклидами и их анализа

методом ТСХ; проведении экспериментов по оценке устойчивости в биологических средах, участии в квантово-химическом моделировании строения комплексов; и изучении биораспределения комплексов и свободных катионов в организме лабораторных мышей, обобщении и систематизации результатов; подготовке основных публикаций по выполненной работе.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на следующих конференциях: XXI Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии 2020; IV Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов Радиофарма-2021»; 5-я Российская конференция МедХим-Россия 2021; X Российская конференция Радиохимия-2022; Ильинские чтения 2022; 20th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №18-73-10035. Исследование выполнено на оборудовании коллективной исследовательской базы вычислительных ресурсов НРС МГУ им. М.В. Ломоносова (расчеты DFT). Экспериментальные исследования частично проводились на оборудовании, приобретенном на средства Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Всего по материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ: из них 5 статей, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, и 6 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций.

1. Zamurueva L.S., Egorova B. V, Ikonnikova I.S., Zubenko A.D., Pashanova A. V, Karnoukhova V.A., Mitrofanov A.A., Trigub A.L., Moiseeva A.A., Priselkova A.B. Effect of the type of N-substituent in the benzo-18-azacrown-6 compound on copper (II) chelation: complexation, radiolabeling, stability in vitro, and biodistribution in vivo // Dalton Transactions, Q1, 2023. № 23(52). P. 8092–8106.

2. Egorova B.V., Zamurueva L.S., Zubenko A.D., Pashanova A.V., Mitrofanov A.A., Priselkova A.B., Fedorov Y.V., Trigub A.L., Fedorova O.A., Kalmykov S.N. Novel Hybrid Benzoazacrown Ligand as a Chelator for Copper and Lead Cations: What Difference Does Pyridine Make // *Molecules*, Q1, 2022. Vol. 27, № 10, P. 3115
3. Б. В. Егорова, Л. С. Замуруева, А. Д. Зубенко, А. В. Пашанова, З. С. Пилай, О. А. Федорова, С. Н. Калмыков Триацетат бензоазакраун-соединения в качестве хелатора катионов свинца в составе целевого радиофармпрепарата // *Макрогетероциклы*, Q3, 2021. 14(2) 157-163.
4. Zubenko A.D., Egorova B.V., Zamurueva L.S., Kalmykov S.N., Fedorova O.A. Synthesis of benzoaza-15(18)-crown-5(6) ethers and study of their complexes with lead (II) // *Mendeleev Communication*, Q3, 2021. Vol. 31, № 2. P. 194–196.
5. Aleshin G.Y., Egorova B.V., Priselkova A.B., Zamurueva L.S., Khabirova S.Y., Zubenko A.D., Karnoukhova V.A., Fedorova O.A., Kalmykov S.N. Zinc and copper complexes with azacrown ethers and their comparative stability in vitro and in vivo // *Dalton Transactions*, Q1, 2020. Vol. 49, № 19. P. 6249–6258.

1. Обзор литературы

1.1 Соединения меди в ядерной медицине

1.1.1 Роль меди в организме

Медь – микроэлемент, содержание которого в организме человека составляет приблизительно 1,4–2,1 мг на кг массы тела (самые высокие концентрации в печени и мозге). Медь действует как восстановитель в ферментах супероксиддисмутаза, цитохромоксидаза, лизилоксидаза, дофамин гидроксилаза и некоторых других оксидазах, которые восстанавливают молекулярный кислород [1]. Ионы меди необходимы для множества биологических процессов, например, для развития соединительной ткани, оболочек нерва и костей. Они необходимы в качестве каталитических кофакторов многих ферментов – церулоплазмينا, супероксиддисмутаза, тирозиназы и других [2]. Церулоплазмин отвечает за перенос меди и проявляет антиоксидантные свойства в организме. Хотя точный механизм поглощения катионов меди клетками человека еще не полностью выяснен, 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^+ редуктазами. В этой восстановленной степени окисления ионы Cu^+ затем транспортируются через клеточную мембрану транспортером меди hCTR1, где они впоследствии связываются с глутатионом, который предположительно ведет себя как первичный акцептор Cu^+ [3]. После этого внутри клетки ионы меди улавливаются медными шаперонами и доставляются в цитозоль, митохондрии и транс-отдел аппарата Гольджи [4]. В аппарате Гольджи медь включается в состав медьсодержащих ферментов. Медь в большей степени аккумулируется в печени, и гепатобилиарная система является основным путем выведения избыточных ионов меди из организма.

Ионы меди играют еще одну 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. Несколько исследований показали, что ионы меди глубоко вовлечены в развитие и прогрессирование рака. Экспериментальные данные ясно свидетельствуют о повышенном уровне накопления меди в злокачественных тканях [5,6].

1.1.2 Медицинские изотопы меди

Существует пять изотопов меди с подходящими для применения в медицине ядерно-физическими свойствами (таблица 1).

Изотоп меди ^{64}Cu является β^+ - и β^- -излучателем, что позволяет применять его как для проведения диагностики, так и терапии с использованием одних и тех же радиоактивно-меченых препаратов. Для получения данного радионуклида можно облучать металлические мишени природного изотопного состава цинка дейтронами [7] или никеля протонами [8], но при данных способах помимо целевого получают другие изотопы меди, а также большое количество побочных продуктов. Чтобы повысить выход целевого изотопа, предлагается обогащение цинка и никеля по изотопам с массовым числом 64, однако это накладывает экономические ограничения на использование радиофармпрепаратов с этим радионуклидом. Изотоп ^{64}Zn стоит дешевле, чем ^{64}Ni , но удельная активность ^{64}Cu , полученной в циклотроне по реакции $^{64}\text{Zn}(d,2p)^{64}\text{Cu}$ значительно ниже, чем по реакции $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ [9]. Для последней реакции необходимы невысокие энергии протонов, которые доступны в уже клинически используемых циклотронах, поэтому в настоящее время, в основном, используется метод получения ^{64}Cu из мишени, обогащенной по ^{64}Ni , в циклотронах. Кроме того, существуют коммерчески доступные полностью автоматизированные системы для выделения целевого продукта [10–12].

Таблица 1. Ядерно-физические свойства изотопов меди [13]

Радионуклид	$T_{1/2}$	$E_{\max} \beta^{-}$, МэВ (%)	$E_{\max} \beta^{+}$, МэВ (%)	ЭЗ	$E \gamma$, кэВ (%)
^{64}Cu	12,7 ч	0,6 (39%)	0,7 (17,4 %)	43,6%	1345,8 (0,5%) 511 (34,8%)
^{67}Cu	61,8 ч	0,6 (20%) 0,5 (22%) 0,4 (57%) 0,2 (1%)	–	–	184,6 (48,7%) 93,3 (16,1%) 91,3 (7%)
^{62}Cu	9,7 мин	–	2,9 (97,2%)	2,8%	511 (194,9%) 1173 (0,342%)
^{61}Cu	3,3 ч	–	1,2 (51%) 1,1 (2,3%) 0,9 (5,5%) 0,6 (2,6%)	38,6%	656 (10,8%) 511 (120,9%) 373,1 (2,1%) 283 (12,2%) 67,4 (4,2%)
^{60}Cu	23,7 мин	–	3,8 (5%) 2,9 (15%) 2,5 (2,8%) 2 (49%) 1,9 (11,6%) 1,8 (4,6%)	12,01%	3124,1 (4,8%) 2158,9 (3,3%) 1861,6 (4,8%) 1791,6 (45,4%) 1332,5 (88%) 1035,2 (3,7%) 826,4 (21,7%) 511 (185,2%) 467,3 (3,5%)

^{64}Cu также является радионуклидом, который может быть использован для тераностики из-за комбинации β^{-} и γ излучения. Этот изотоп имеет больший период полураспада (61,8 часов) по сравнению с ^{64}Cu , что наиболее благоприятно для применения в терапии, но несмотря на эти характеристики,

его использование в терапии пока не так распространено из-за особенностей его получения и наработки [14]. Терапевтические количества ^{67}Cu могут быть получены по нескольким реакциям из изотопов цинка. Реакция $^{68}\text{Zn}(p,2p)^{67}\text{Cu}$ изучена при различных энергиях (от 20 до 100 МэВ) [15,16]. Наилучшие результаты достигаются при использовании протонов с энергией 70 МэВ, что приводит к образованию множества побочных продуктов, а также требует использования высокоэнергетических циклотронов. Несколько исследований посвящены изучению реакции $^{70}\text{Zn}(p,\alpha)^{67}\text{Cu}$, для которой требуются протоны с энергией 20 МэВ, что позволяет использовать медицинские циклотроны. Присутствие ^{67}Ga затрудняет измерение нарабатываемой радиоактивности, поэтому данный метод изучен не до конца. Получение меди по реакции $^{70}\text{Zn}(p,\alpha)^{67}\text{Cu}$ является перспективным, учитывая низкое количество образующихся примесей, и доступность протонов с такой энергией [7]. Возможно получение ^{67}Cu в ядерных реакторах по реакции $^{67}\text{Zn}(n,p)^{67}\text{Cu}$. Как и $(p,2p)$, эта реакция приводит к побочным продуктам и требует очистки от радиоактивных примесей, однако выход этой реакции выше [17]. В литературе также сообщается о получении ^{67}Cu по реакции $^{68}\text{Zn}(\gamma,p)^{67}\text{Cu}$ с использованием линейных ускорителей, генерирующих электроны с энергией 30–60 МэВ. При использовании природного цинка возможна побочная реакция $^{66}\text{Zn}(\gamma,d)^{64}\text{Cu}$, которую можно устранить обогащением цинка по 68 изотопу или выдерживанием облученной мишени в течение нескольких суток [18].

Изотоп ^{62}Cu распадается с испусканием β^+ -частиц, что делает этот изотоп пригодным для позитронно-эмиссионной томографии. В отличие от других изотопов меди, ^{62}Cu 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 нуклида ^{62}Zn (около 9 часов) не позволяет этому генератору работать дольше нескольких дней. Ранее для генератора предлагалось использовать анионообменную смолу, но полученные таким образом растворы имели высокое осмотическое давление и низкое значение

pH, что является недостатком для дальнейшего синтеза радиофармпрепаратов на основе этого радионуклида, учитывая его небольшой период полураспада [19]. В настоящее время используется катионообменная смола, которая позволяет выделять целевой продукт с выходом 96% [20]. Радионуклид ^{62}Zn при этом получают облучением медной мишени протонами с энергией 30 МэВ

Другой изотоп меди ^{62}Cu испускает β^+ -частицы с разными энергиями, что обычно затрудняет получение изображений с оптимальным пространственным разрешением. Получают ^{61}Zn облучением протонами цинка, обогащенного ^{64}Zn изотопом, в диапазоне энергий 20–70 МэВ [13].

^{60}Cu также является β^+ -излучателем, но дополнительно испускает каскад высокоэнергетических γ -квантов, которые могут ухудшать разрешение при проведении томографических исследований из-за вторичных процессов. Этот радионуклид может быть получен на медицинских циклотронах облучением никеля, обогащенного ^{60}Ni изотопом, что является относительно недорогим методом [21,22].

Стоит отметить, что в последние 10 лет внимание сконцентрировано на ^{64}Cu и ^{67}Cu изотопах меди, которые могут применяться как сами по себе в тераностических целях, так и составлять пару с радиофармпрепаратами на основе радионуклидов других металлов. Остальные три рассматриваются только в качестве доступных аналогов для научных целей, их применение в медицине затруднено из-за относительно коротких периодов полураспада.

1.1.3 Хелаторы для меди

Согласно принципу жёстких и мягких кислот и оснований (ЖМКО) катион Cu^{2+} является промежуточной кислотой. Для Cu^{2+} ($\text{кч} = 4\text{--}6$, $\text{Ri}=0,57\text{--}0,73 \text{ \AA}$ [23]) предпочтительна октаэдрическая ($\text{кч} = 6$, $\text{Ri}=0,73 \text{ \AA}$) координация, а также ее искажения в виде квадратной пирамиды ($\text{кч} = 5$, $\text{Ri}=0,65 \text{ \AA}$), либо плоско-квадратной геометрии ($\text{кч} = 4$, $\text{Ri}=0,57 \text{ \AA}$). Помимо этого существует значительное количество низкомолекулярных кристаллических структур, содержащих медь(II) в тригональной бипирамидальной геометрии [24].

Изотопы меди для ядерной медицины изучались в течение нескольких десятков лет, и за это время было приложено много усилий по разработке хелаторов для связывания катионов меди с векторными молекулами. В первую очередь важно было преодолеть кинетическую лабильность, которая приводит к потере радиоактивного катиона *in vivo*. Различные макроциклы предлагались и исследовались для этих целей с Cu^{2+} (рис. 2): ТЕТА (1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусная кислота) изначально был предложен для связывания ^{64}Cu и ^{67}Cu [25], но в *in vivo* условиях наблюдалась небольшая диссоциация комплекса, поэтому были предложены их модификации, например, кросс-мостиковый аналог СВ-ТЕ2А.

Комплекс с хелатором СВ-ТЕ2А показал наибольшую устойчивость по сравнению со своим предшественником, однако для получения устойчивого комплекса требовались более жесткие условия – нагрев при 95°C в течение часа [26], что затрудняло синтез препаратов.

Лиганд ДОТА (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), универсальный и применяемый для многих радионуклидов металлов, например, для иттрия, лютеция, галлия и индия, также широко использовался и для меди, однако в некоторых случаях наблюдалась небольшая (до 10-20%) диссоциация данного комплекса [27].

Дальнейшие исследования различных хелаторов показали, что хелатор NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусная кислота), саркофагин (SAR; 3,6,10,13,16,19-гексазабицикло[6.6.6]икозан), а также их аналоги требуют более мягких условий синтеза при комплексообразовании, а образуемые с ними комплексы характеризуются высокой устойчивостью как *in vitro*, так и *in vivo* [28,29].

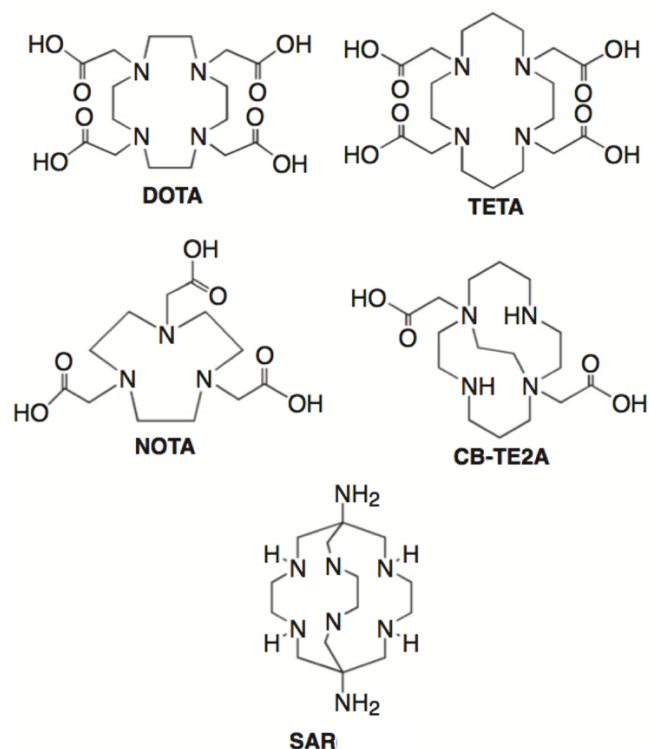


Рис. 2. Основные хелаторы, исследуемые для изотопов меди.

Из-за большого интереса к изотопам меди было проведено много исследований, посвященных влиянию различных заместителей на свойства получаемых комплексов с катионами меди. Вследствие сродства Cu^{2+} к атомам азота подробно изучены аналоги NOTA, где ацетатные заместители заменяются на пиридиновые и пиколинатные в разном количестве и соотношении (рис. 3) [30]. Комплекс с 3 пиридиновыми заместителями обладает константой устойчивости выше $\lg\beta(\text{CuL})=27,4$, чем с NOTA $\lg\beta(\text{CuL})=21,6$. Однако, замена пиридинов на пиколинаты приводит к последовательному снижению константы комплексообразования. При этом лиганды с 2 и 3 пиколинатными заместителями способны образовывать не только моно-, а также биядерные комплексы с Cu^{2+} в связи с большим количеством донорных групп.

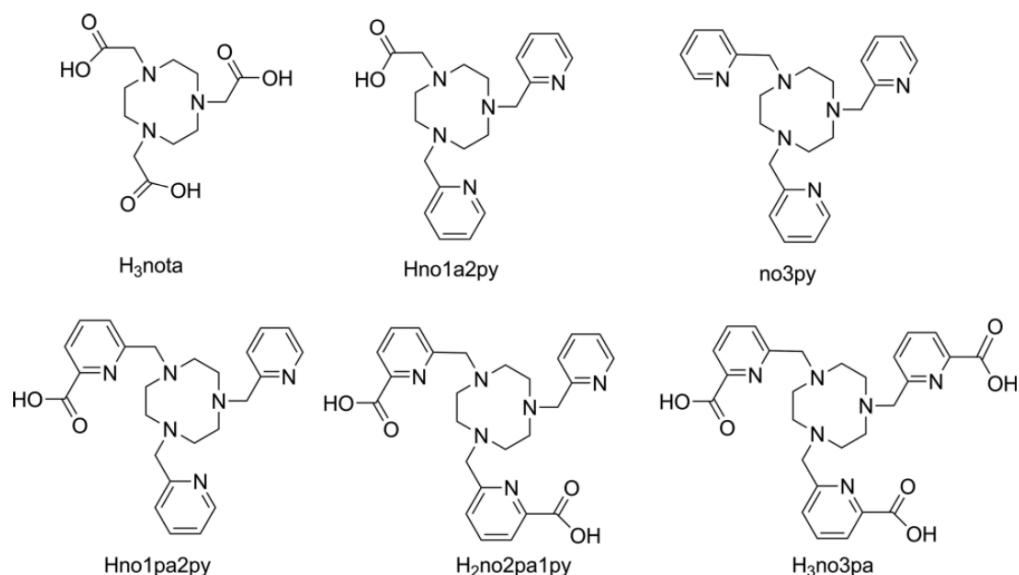


Рис. 3. Хелатор NOTA и его аналоги [30].

Влияние пиколинатных и пиридиновых заместителей также исследовалось для макроциклов циклена и циклама [31] (рис. 4). В случае первого наличие пиколинатной группы привело к незначительному увеличению константы устойчивости $\lg\beta(\text{CuL})=24,0$ по сравнению с цикленом $\lg\beta(\text{CuL})=23,4$, а пиридиновой – к снижению $\lg\beta(\text{CuL})=21,0$. Для циклама $\lg\beta(\text{CuL})=28,1$ введение обеих групп – пиколинатной $\lg\beta(\text{CuL})=25,5$ и пиридиновой $\lg\beta(\text{CuL})=23,0$, привело к снижению констант.

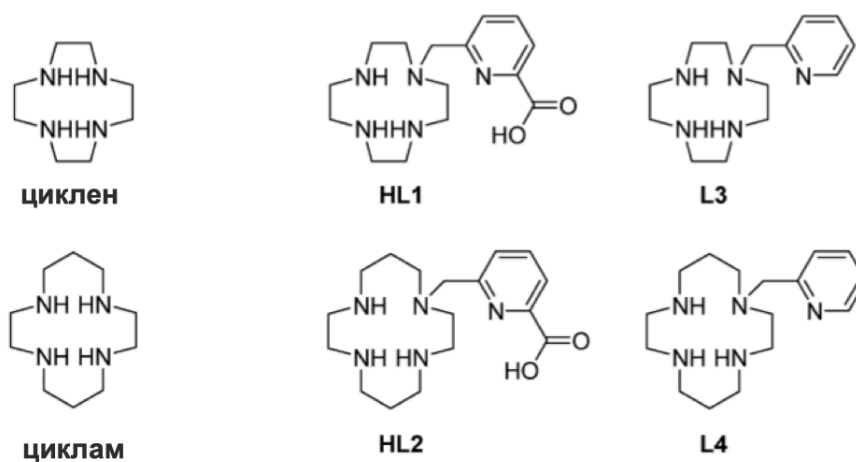


Рис. 4. Хелаторы циклен, циклам и их аналоги [31].

Подробно был изучен аналог циклама с пиколинатным заместителем НТЕ1РА (HL2, рис. 4), он образует устойчивые *in vitro* комплексы с медью. При введении данного комплекса в организм мышей в первые часы

наблюдается большое накопление нуклида в печени, однако через 12 часов комплекс в основном выводится из организма. Так как в отобранных пробах (экстракт из печени) удастся идентифицировать радионуклид именно в форме исследуемого комплекса, предполагается, что сам комплекс имеет длительный метаболизм в организме, но остается устойчивым [32,33].

Обобщая имеющиеся данные по наиболее исследуемым и применяемым в радиофармпрепаратах хелаторам меди, стоит отметить, что для данного катиона стабильные комплексы образуются с макроциклическими лигандами, однако они все требуют нагревания или продолжительного времени синтеза (таблица 2). Наименьшее время требуется для связывания с аналогами саркофагина, однако в основном данный хелатор рассматривался только с катионами меди, что ограничивает его применение в качестве тераностической пары к радионуклидам других металлов.

Таблица 2. Устойчивость комплексов меди с исследуемыми в литературе хелаторами [34]

Хелатор	Условия синтеза комплекса	Результаты
DOTA и аналоги	25–90°C, 30–60 мин	Частично диссоциирует <i>in vivo</i>
TETA	25°C, 60 мин	Частично диссоциирует <i>in vivo</i>
CB-TE2A	95°C, 1 час	Устойчив <i>in vivo</i>
SAR и аналоги	25°C, 5–30 мин	Устойчив <i>in vivo</i>
NOTA и аналоги	25°C, 30–60 мин	Устойчив <i>in vivo</i>

1.1.4 Клинические исследования с изотопами меди



Из-за способности ионов меди накапливаться в гипоксических опухолевых тканях, изучается возможность использования $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ для диагностики и терапии [35].

Результаты, полученные в доклинических исследованиях на животных с различными злокачественными новообразованиями, подтверждают гипотезу о том, что ионы $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ действительно подходят для молекулярной визуализации и терапии различных видов рака [36–38].

Эти эксперименты ясно подтвердили, что катионы меди избирательно накапливаются в различных раковых тканях и, в отличие от 2- $[^{18}\text{F}]\text{фтор-2-дезоксид-Д-глюкозы}$, которая широко используется в ПЭТ, не участвуют в воспалительных процессах. Таким образом, можно предположить, что $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ ведет себя как высокоспецифичный опухолевый маркер. В этих исследованиях измеряли экспрессию транспортера меди hCTR1 – белка, который сверхэкспрессируется в некоторых раковых клетках, в группе клеточных культур, включая клетки рака предстательной железы, легких, яичников и молочной железы, меланому и глиобластому, и сравнивали полученные данные с накоплением $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$. Экспериментальные данные показали, что повышенное накопление меди всегда было связано с избыточной экспрессией hCTR1 в этих раковых клетках, что позволяет предположить потенциальное тераностическое использование $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ для hCTR1-экспрессирующих злокачественных новообразований.

Несколько предварительных экспериментальных данных на людях убедительно подтверждают доклинические наблюдения. У здоровых людей наибольшее накопление катионов меди наблюдалось в печени, также изотоп ^{64}Cu обнаруживается в мозге, почках и поджелудочной железе.

Были опубликованы результаты II фазы клинического исследования, целью которого было биораспределение и дозиметрия $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ у пациентов с рецидивирующим раком предстательной железы (РПЖ). Эта работа была первой попыткой сравнить диагностические характеристики ПЭТ/КТ, проведенные как с $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$, так и с $[^{18}\text{F}]\text{фторхолином}$, с

многопараметрической МРТ при оценке РПЖ. Результаты, полученные у этих пациентов, предоставили дополнительные доказательства эффективности $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ в выявлении опухоли наряду с метастазами в костях и лимфатических узлах. Частота обнаружения $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ была значительно выше, чем для $[^{18}\text{F}]\text{фторхолина}$, особенно при выявлении рецидива. Эффективная доза, вводимая пациентам с $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$, была аналогична той, которая измерялась для других распространенных индикаторов ПЭТ (5,7 мЗв).

Еще одно предварительное клиническое исследование было проведено для оценки возможности визуализации ПЭТ/КТ опухолей головного мозга с $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ у пациентов с мультиформной глиобластомой. Сравнение с МРТ как эталонным методом визуализации показало соответствие между двумя диагностическими методами. ПЭТ/КТ-визуализация с $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ четко выявила раковые ткани мозга через 1 час после инъекции. Стабильное удержание радиоактивности в поражениях головного мозга продолжалось более 24 часов. Опять же, эти результаты подтвердили доклинические наблюдения и указали на потенциал $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ в качестве диагностического индикатора для злокачественных опухолей головного мозга (рис. 5) [39,40].

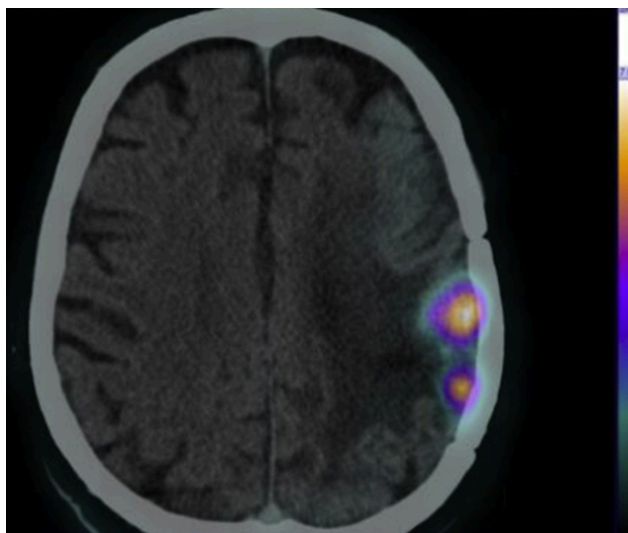


Рис. 5. Пациент с церебральной глиобластомой. Изображение на ПЭТ/КТ через 1 час после инъекции $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ [40].

$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOТАТATE}$

Радионуклидная терапия пептидных рецепторов с использованием радиоактивно меченых аналогов соматостатина (SSA) является признанным методом лечения высокодифференцированных гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных новообразований.

Воздействие происходит на рецепторы соматостатина – пептида, состоящего из 14 или 28 остатков аминокислот. Некоторые типы опухолей, особенно с нейроэндокринными характеристиками, экспрессируют рецепторы соматостатина. Синтетические пептидные аналоги соматостатина первого поколения – октреотид и ланреотид, являются одобренными во всем мире препаратами для контроля гормональной гиперсекреции и опухолевого роста. Широкое применение данные пептиды нашли в ПЭТ диагностике с ^{68}Ga : ^{68}Ga -DOTATOC/TATE/NOС [41]. Также существует терапевтический аналог – ^{177}Lu -DOTATATE (Lutathera) [42]. К настоящему времени уже клинически продемонстрирована высокая эффективность альфа-эмиттеров ^{225}Ac , ^{213}Bi , связанных с DOTATOC/TATE, для терапии нейроэндокринных опухолей (НЭО) [43].

Препарат с аналогом соматостатина ^{64}Cu Cu-DOTATATE успешно прошел клинические испытания и одобрен в США для ПЭТ нейроэндокринных опухолей (НЭО). [44].

Данный препарат сравнивали с «золотым» стандартом диагностики НЭО [^{111}In]In-DTPA-OC (ДТПА-октреотид). Было проведено исследование 112 пациентов с НЭО. В случае использования препарата с изотопами меди выявление очагов было в 2 раза чаще [45,46].

Еще одно исследование было проведено для сравнения ^{64}Cu Cu-DOTATATE с ^{68}Ga Ga-DOTATOC. Более короткий пробег позитронов, испускаемых ^{64}Cu , чем ^{68}Ga , теоретически приводит к лучшему пространственному разрешению, а период полураспада 12,7 часов делает ^{64}Cu Cu-DOTATATE более привлекательным для рутинного использования в условиях клиник по сравнению ^{68}Ga , период полураспада которого составляет всего 68 минут. Препарат с радионуклидом меди позволял чаще обнаруживать

очаги у пациентов с нейроэндокринными опухолями по сравнению с галлиевым препаратом, что подтверждает его преимущества [47].

Стоит отметить также дозовую нагрузку, оказываемую данными препаратами на пациента. Средняя доза препарата $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOТАТАТЕ}$ 180–220 МБк приводит к дозе облучения пациента 5,7–8,9 мЗв [45], а 120–200 МБк $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOТАТОС}$ дает 2,8–4,6 мЗв [48], для препаратов $[^{111}\text{In}]\text{In-DТРА-ОС}$ и $[^{111}\text{In}]\text{n-DOТАТОС}$ – 5,7–11,1 мЗв и 7,0–10,0 мЗв соответственно [49].

Сравнение качества изображений, полученных с ^{111}In и ^{64}Cu , показало более четкую визуализацию очагов при использовании препарата $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOТАТАТЕ}$ (рис. 6А). По сравнению с ПЭТ/КТ изображением, полученным при введении $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOТАТОС}$, в случае $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOТАТАТЕ}$ удалось идентифицировать дополнительные очаги поражения в области кишечника (рис. 6Б).

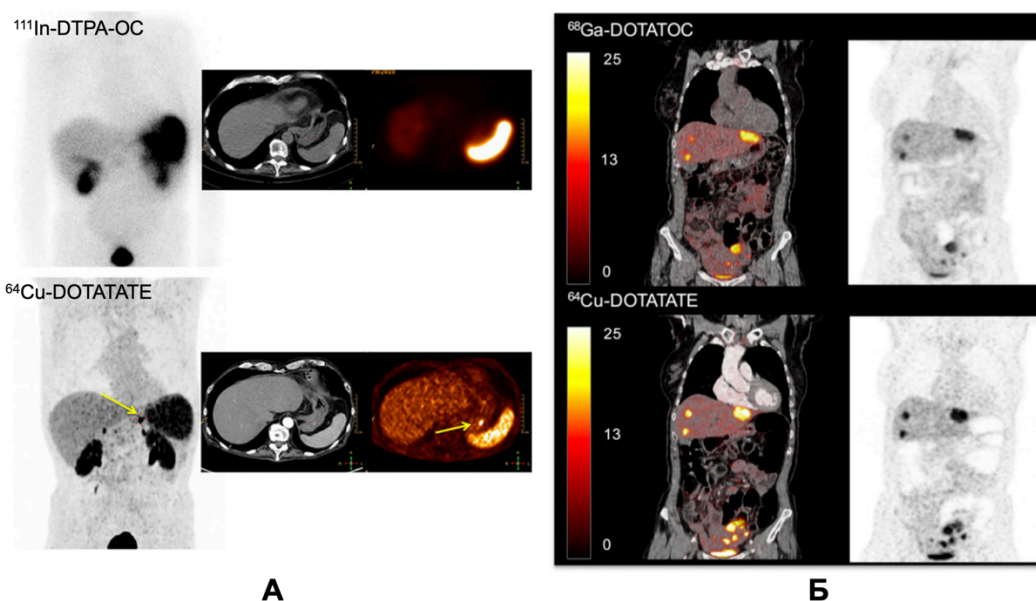


Рис. 6. Сравнение изображений ПЭТ/КТ $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOТАТАТЕ}$ с $[^{111}\text{In}]\text{In-DТРА-ОС}$ [46] (ОФЭКТ) (А) и $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOТАТОС}$ [47] (ПЭТ/КТ) (Б).

$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$, $[^{67}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$

Еще один препарат на основе ^{64}Cu $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-SARTATE}$ прошел клинические испытания для диагностики нейроэндокринных опухолей [44].

Область применения данного препарата аналогична [⁶⁴Cu]Cu-DOTATATE, т.к. отличие заключается только в хелаторе, используемом для связывания Cu²⁺. Преимущество препаратов на основе саркофагина (SAR) по сравнению с теми, где в качестве хелатора используется DOTA, состоит в том, что комплексы саркофагина с медью более стабильны в организме. В мышинной модели поглощение [⁶⁴Cu]Cu-SARTATE в опухолях, экспрессирующих соматостатиновые рецепторы, через 2 часа было высоким (63,0 ± 15,0 %введенной дозы/г), и оставалось высоким через 24 часа (105 ± 27,1 %введенной дозы/г). Такое высокое удержание на поздних временных точках делает класс данных препаратов перспективным для дальнейшего использования в терапевтических целях.

Для данного препарата наблюдается высокое удержание в опухолях и значительный клиренс через печень, что приводит к увеличению контраста поражений в печени. В отличие от препарата с радионуклидом ⁶⁸Ga, наиболее четкие изображения получаются через 4 и 24 часа. Эффективная доза облучения всего тела составляет примерно 9 мЗв при вводимой активности 200 МБк, эта оценка согласуется с предыдущими данными о дозах для [⁶⁴Cu]Cu-DOTATATE.

Высокое поглощение и удержание [⁶⁴Cu]Cu-SARTATE в опухолях и сопутствующее выведение активности из печени обеспечивает высококонтрастные диагностические изображения, по крайней мере, в течение 24 часов после инъекции, расширяя временной диапазон для диагностической визуализации. Препарат с данным лигандом перспективен и для терапевтических целей с использованием ⁶⁷Cu [50]. Противоопухолевая эффективность препарата с ⁶⁷Cu в исследовании на животных была эквивалентна эффективности препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTATATE (Lutate) [51].

Другие клинические исследования

Выше были рассмотрены основные препараты, проходящие или уже прошедшие разные стадии клинических испытаний. В настоящее время

продолжает появляться много новых кандидатов для диагностики и терапии, пока в основном это препараты с ^{64}Cu .

Хорошие результаты при исследованиях на пациентах показал препарат [^{64}Cu]Cu-PSMA-617 для диагностики рака предстательной железы. В этих исследованиях были получены четкие ПЭТ-изображения с высоким разрешением через 1 и 2 часа после инъекции. Опухоли были выявлены у пациентов с раком предстательной железы, далее подтвержденным с помощью гистологии [52,53].

Первое клиническое исследование на людях было проведено для изучения препарата [^{64}Cu]Cu-DOTA-AE105 у пациентов с раком молочной железы, простаты и мочевого пузыря [54]. Этот препарат содержит высокоаффинный пептидный антагонист AE105, нацеленный на рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR), который экспрессируется при многих типах рака. Были четко идентифицированы первичные опухоли и метастатические лимфатические узлы при раке простаты, молочной железы и мочевого пузыря. В препарате ^{64}Cu -uPAR ([^{64}Cu]Cu-NOTA-AE105) хелатор DOTA заменен на NOTA, который образует более стабильные комплексы с Cu^{2+} . Данный препарат показал многообещающие результаты при диагностике глиобластомы, и в настоящее время проводятся дальнейшие клинические испытания [55].

Препарат с моноклональным антителом против колоректальной карциномы ([^{64}Cu]Cu-MAb 1A3) с использованием хелатора TETA в качестве бифункционального агента оценивали у пациентов с подозрением на прогрессирующий первичный или метастатический колоректальный рак. Результаты фазы I/II позволяют предположить, что использование данного препарата подходит для обнаружения небольших очагов колоректальной опухоли в брюшной полости или тазу и для осуществления предварительной дозиметрии [56].

Препарат [^{64}Cu]Cu-TP3805 предлагается использовать для визуализации рака предстательной железы, он нацелен на VPS1 – надсемейство

рецепторов, связанных с G-белком, которые экспрессируются с высокой плотностью на клетках рака предстательной железы, но не на нормальных клетках. Преимущество данного препарата в том, что он не визуализирует доброкачественные состояния предстательной железы, что сведет к минимуму количество биопсий. ^{64}Cu Cu-TP3805 специфичен для VPS1 и показывает хорошие результаты [57].

Можно отметить, что большая часть клинических исследований посвящена препаратам на основе радионуклида ^{64}Cu в качестве диагностического агента, а для его хелатирования используются макроциклические хелаторы DOTA и SAR (рис. 2).

1.2 Соединения свинца в ядерной медицине

1.2.1 Роль свинца в организме и медицинские изотопы свинца

С медицинской точки зрения свинец редко представляет интерес, так как он оказывает токсическое действие на организм. Свинец является токсичным элементом, который может попадать в организм человека через пищеварительные или дыхательные пути. В организме большая часть ионов Pb^{2+} транспортируется через эритроциты в кровоток, затем в различные ткани и органы. Свинец оказывает неблагоприятное воздействие на определенные системы органов, такие как центральная нервная система, сердечно-сосудистая система, почки и иммунная система [58]. Катионы свинца накапливаются в костной ткани [59]. Большая концентрация свинца в организме приводит к множеству осложнений, в том числе и к летальному исходу [60]: концентрация ионов свинца в крови не должна превышать 100 мкг/л [61]. Несмотря на то, что химические свойства свинца вызывают ряд неблагоприятных последствий для здоровья, направленное физическое воздействие распада некоторых его радионуклидов является областью с доказанным медицинским потенциалом, который продолжает расти с доступностью радионуклидов.

С точки зрения ядерной медицины интерес представляют два изотопа свинца: ^{203}Pb ($T_{1/2} = 51,9$ ч) и ^{212}Pb ($T_{1/2} = 10,6$ ч). ^{203}Pb – это диагностический изотоп, который распадается в результате электронного захвата, высвобождая фотон с энергией 279 кэВ (81%), что делает возможным его использование в однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ). ^{212}Pb может быть использован в качестве терапевтического агента. Несмотря на то, что сам ^{212}Pb является β -излучателем, он используется для направленной альфа-терапии, поскольку действует как *in vivo* генератор своих альфа-излучающих дочерних радионуклидов ^{212}Bi ($T_{1/2} = 60,5$ мин, $E_{\alpha} = 6,3$ МэВ, 36%) и ^{212}Po ($T_{1/2} = 0,3$ мкс, $E_{\alpha} = 7,4$ МэВ). Более длительный период полураспада ^{212}Pb по сравнению с его дочерними нуклидами позволяет увеличить время подготовки препарата и его действия. Возможно совместное использование двух изотопов свинца в качестве тераностической пары [62]. Это является преимуществом перед рядом других альфа-излучателей, для которых нет химически идентичных диагностических пар.

Для радиофармацевтических целей диагностический изотоп ^{203}Pb получают на циклотронах путем бомбардировки заряженными частицами (протонами, дейтронами и альфа-частицами) мишени из таллия природного изотопного состава (^{203}Tl 29,5%, ^{205}Tl 70,5%) [63]. После облучения мишень растворяют и загружают на Pb-селективную экстракционную смолу [64,65] или анионообменную смолу [66].

Терапевтический изотоп ^{212}Pb получают с помощью генераторов. Данный нуклид является членом радиоактивного ряда ^{232}Th и обычно выделяется из генераторов на основе ^{228}Th ($T_{1/2} = 1,9$ года) [67,68] и ^{224}Ra ($T_{1/2} = 3,64$ дня) [69–71] (рис. 7). При использовании таких генераторов ^{212}Pb возможно элюировать каждые сутки.

Многие генераторы на основе ^{228}Th используют химическое или физическое разделение дочерних ^{224}Ra [72] и ^{220}Rn [67,68] с использованием катионообменных колонок и стеклянных барботеров. При переходе к более высоким активностям наблюдается радиолитическое повреждение материала

генераторов на основе тория. В настоящее время чаще используются генераторы, где предварительно выделен ^{224}Ra , из которого затем выделяется ^{212}Pb на катионообменной [69,71,73] смоле или селективных экстракционных смолах для выделения актинидов [70] или свинца [64].

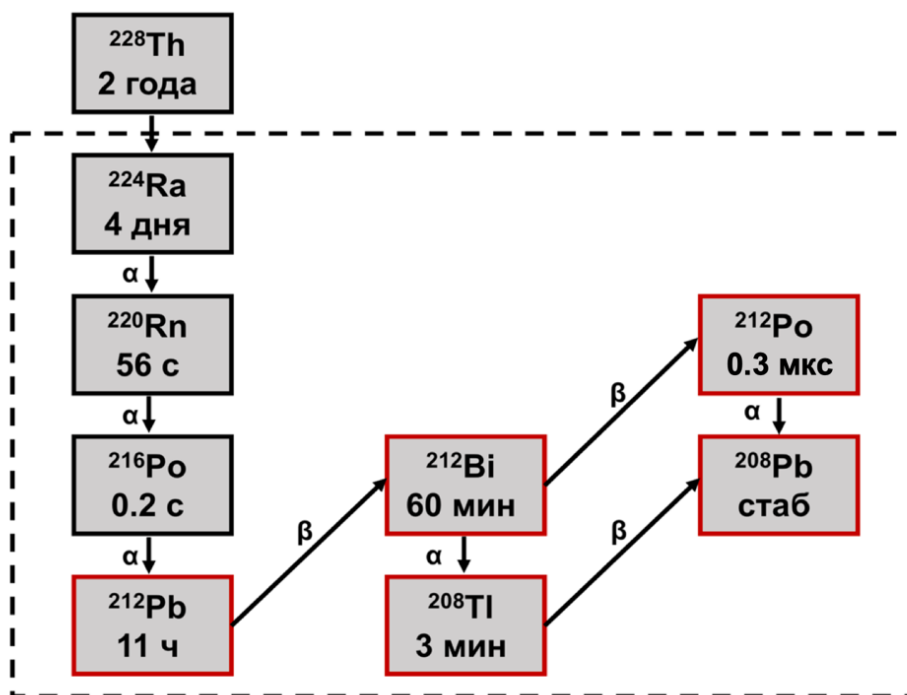


Рис. 7. Схема распада ^{224}Ra (включая материнский ^{228}Th), используемого для генератора $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$.

1.2.2 Хелаторы для свинца

Катион Pb^{2+} является промежуточной кислотой Льюиса в соответствии с принципом жёстких и мягких кислот и оснований (ЖМКО) и может образовывать стабильные комплексы с различными соединениями, содержащими атомы азота, кислорода, серы и фосфора. В своих соединениях Pb^{2+} встречается с различными координационными числами (6–12) и геометрией и характеризуется большим ионным радиусом в диапазоне от 1,19 до 1,49 Å [23].

В качестве комплексообразующего хелатора для свинца рассматривался известный хелатор DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота) (рис. 8). Было показано, что комплексы свинца и

висмута с данным хелатором не диссоциируют при pH 4–9. Однако при исследовании комплекса с ^{212}Pb было обнаружено, что около трети дочернего висмута высвобождается из комплекса [64,74,75]. Высвобождение висмута из состава данного комплекса относят к последствиям распада свинца. Распад ^{212}Pb приводит к двум типам внеядерных возбуждений: во-первых, кинетическая энергия передается дочернему атому, во-вторых, индуцируются электронные возбуждения валентной оболочки [75]. Испускание β^- -частиц, γ -квантов, рентгеновских лучей и конверсионных электронов передает кинетическую энергию дочернему ядру. Энергии отдачи от последних трех малы: γ -квант с энергией 238 кэВ обеспечивает только 0,14 эВ энергии возбуждения, что мало по сравнению со средними энтальпиями химической связи, которые колеблются в пределах 1–6 эВ. Более существенная отдача обусловлена испусканием β^- -частиц. ^{212}Pb испускает три β^- -частицы с энергиями (и вероятностями испускания) 153,7 (5%), 330,7 (83%) и 568,6 (12%) кэВ. Средние энергии отдачи, сообщаемые ядру ^{212}Bi от каждой из β^- -частиц, составляют порядка 1 эВ (23,8 ккал/моль, 96,5 кДж/моль). Учитывая, что энергия связи металл(III)-кислород составляет около 116 ккал/моль, а для связи металл(III)-азот 134 ккал/моль, эта энергия слишком мала, чтобы разорвать даже одну связь металл-лиганд для диссоциации комплекса BiDOTA, однако эта энергия будет вносить вклад в общую энергию возбужденного состояния дочерних молекул, поскольку все процессы возбуждения происходят за очень короткий период времени. Среди внеядерных процессов, ответственных за электронное возбуждение дочернего ^{212}Bi , наиболее важными являются изменение заряда ядра в результате β^- -распада ^{212}Pb и внутренние превращения внутриорбитальных электронов, происходящие вместо γ -излучения. Максимальная энергия, которую может приобрести дочерний ^{212}Bi в этом процессе, составляет 130 эВ, что может привести к рождению ^{212}Bi в степени окисления Bi^{5+} . Внутренняя конверсия возникает в результате чисто электромагнитного взаимодействия между возбужденным дочерним ядром и внутриорбитальными электронами и

приводит к испусканию электрона с кинетической энергией ядерного перехода за вычетом энергии связи внеядерного электрона. Таким образом, на внутренней орбитали дочернего ^{212}Bi создается вакансия. Реорганизация орбитальных электронных оболочек висмута сопровождается испусканием характеристического рентгеновского излучения, Оже-электронов или и того, и другого. Значение конверсии γ -квантов с энергией 238 кэВ в оболочках К и L составляет 33,3 %, а общая конверсия всех γ -квантов составляет 37,3 %, что согласуется с третью свободного ^{212}Bi , обнаруженного в экспериментах по определению устойчивости комплексов с DOTA, описанных выше. Это указывает на то, что электронное возбуждение из-за процесса внутренней конверсии является основной причиной высвобождения висмута. Таким образом, использование хелатора DOTA ограничено в случае ^{212}Pb : он может использоваться в случаях, когда комплекс быстро доставляется в опухолевую клетку и не высвобождается из нее, т.к. высвобождение альфа-эмиттера ^{212}Bi может оказать значительное токсическое воздействие на здоровые ткани.

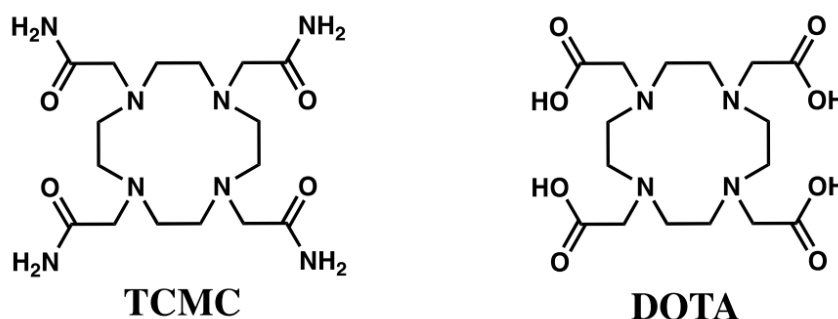


Рис. 8. Основные хелаторы, исследуемые для генераторной пары $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$.

Для генераторной пары $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ широкое применение нашел другой хелатор – TCMC (DOTAM) (S-2-(4-изотиоцианато-бензил)-1,4,7,10-тетрааза-1,4,7,10-тетра(2-карбамо-илметил) циклододекан) (рис. 8). Получение комплекса TCMC с ^{212}Pb может быть легко достигнуто за достаточно короткое время при умеренных температурах (30 мин, 37°C) [76]. При этом свинец связывается уже через 5 минут, а процент связанного висмута растет с 70 до 86 за 30 минут [70]. Однако, высвобождение дочернего продукта распада из комплекса до сих пор остается сложной задачей. В литературе отмечается

частичная диссоциация радионуклида висмута из состава комплекса с ТСМС, однако точных экспериментальных данных для этого хелатора не приведено. Математическое моделирование показало, что при замене хелатора с DOTA на ТСМС высвобождение свинца снижается вдвое (с 36 до 16%) [77].

Помимо упомянутых хелаторов, проводились исследования и с другими молекулами. Предполагается, что так как образование кинетически инертного комплекса DOTA с катионами висмута происходит очень медленно, высвобождающийся ^{212}Bi не может связаться обратно хелатором, поэтому были исследованы ациклические и циклические лиганды, которые быстрее образуют комплексы с катионами висмута, чем DOTA (рис. 9) [69]. Предполагается, что такие хелаторы будут сразу же пересвязывать высвобождающийся висмут.

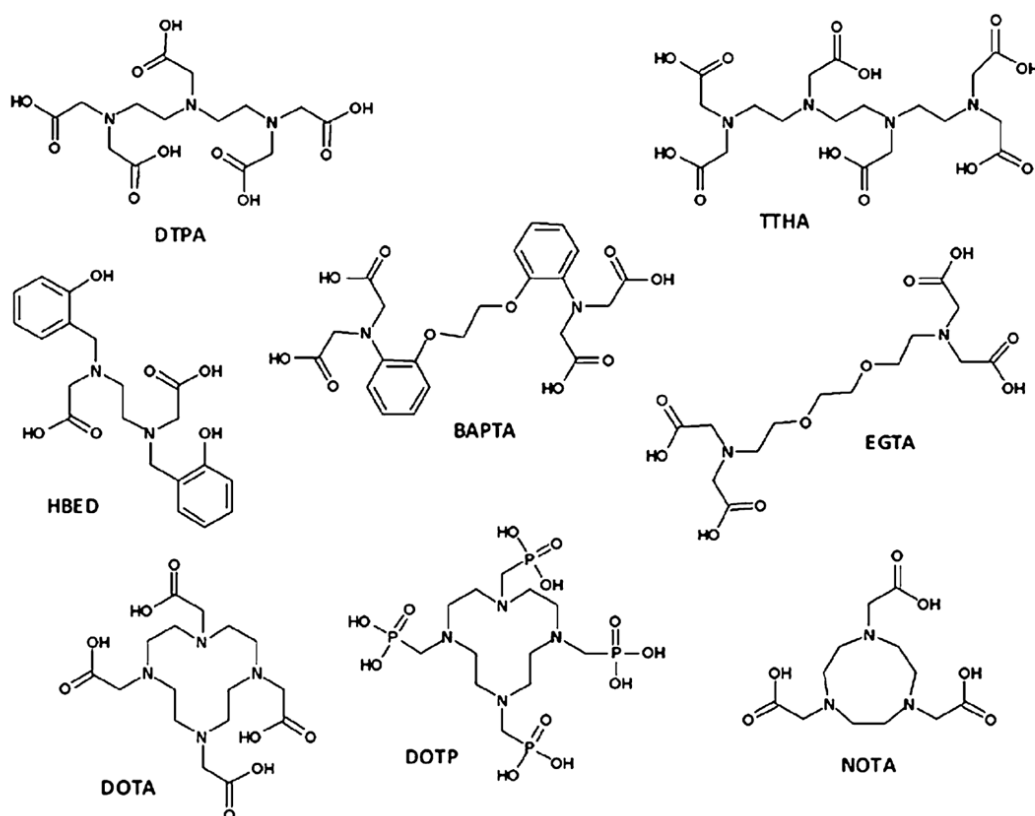


Рис. 9. Хелаторы, предлагаемые для генераторной пары $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ [69].

Данные лиганды обладают высоким сродством к различным трехзарядным катионам: железу и лантаноидам. При одинаковой концентрации лигандов удалось получить комплексы с ^{212}Pb с высоким выходом мечения только с DOTP (1,4,7,10-Тетраазациклододекан-1,4,7,10-

тетраилтетраakis(метилфосфоновая кислота)) и ВАРТА (1,2-Бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота). В изотоническом растворе комплекс свинца с ациклическим ВАРТА оказался неустойчивым, а с циклическим ДОТР – не диссоциирует, а также не наблюдается несвязанных в комплекс катионов висмута. Лиганд ДОТР обладает преимуществом перед ДОТА – он способен связывать катионы висмута при комнатной температуре, за счет чего часть высвободившихся изотопов пересвязываются в состав комплекса. Несмотря на это, этот лиганд не дошел до дальнейших исследований, возможно из-за большого времени образования комплекса (2 часа).

В настоящее время идут исследования еще одного ациклического лиганда – H₂амра [78] (рис. 10). Данный хелатор образует комплексы со свинцом и висмутом при тех же условиях, что и ТСМС. Исследования по устойчивости данного комплекса пока не приводились в литературе.

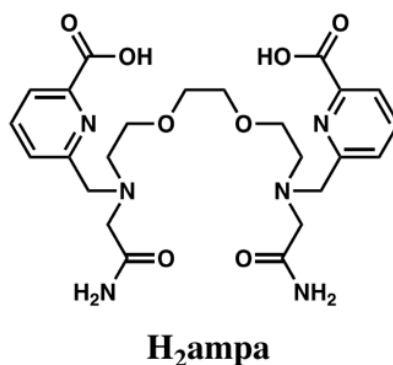


Рис. 10. Хелатор, предлагаемый для генераторной пары ²¹²Pb/²¹²Bi [78].

Для катионов свинца в настоящее время в радиофармпрепаратах предложены только макроциклические лиганды, а в случае ациклического H₂амра пока недостаточно данных, чтобы говорить о его эффективности (таблица 3). Для радионуклида ²¹²Pb на данный момент принят один эффективный хелатор ДОТАМ (ТСМС), однако и для него предполагается высвобождение дочернего нуклида. Со всеми исследуемыми в литературе лигандами для получения комплекса требуется нагревание или выдерживание комплекса при комнатной температуре в течение продолжительного времени. Чем выше скорость связывания с радионуклидами, тем выше вероятность

пересвязывания высвободившегося дочернего висмута. Для связывания радионуклида хелатором DOTAM (ТСМС) достаточно 37°C, однако полное связывание требует времени, поэтому часть висмута все же высвобождается, что показывает частичное накопление в здоровых тканях в организме.

Таблица 3. Устойчивость комплексов свинца с исследуемыми в литературе хелаторами

Хелатор	Условия синтеза комплекса	Результаты
DOTA	25–75°C, 30–60 мин	Наблюдается высвобождение висмута-212 (36%)
DOTAM (ТСМС)	37°C, 30–60 мин	Наблюдается небольшое высвобождение висмута (16%)
DOTP	Комнатная температура, 2 часа	Устойчив в изотоническом растворе, дальше не исследован
ВАРТА	Комнатная температура, 2 часа	Неустойчив <i>in vitro</i>
H ₂ amp	37°C, 30 мин	Пока не исследована устойчивость

1.1.3 Клинические исследования с изотопами свинца

[²¹²Pb]Pb-ТСМС-Trastuzumab

Моноклональные антитела могут транспортировать и селективно доставлять связанные с ними радионуклиды к опухолевым клеткам. Антитело трастузумаб используется в качестве нацеливающего компонента на рецептор эпидермального фактора роста HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2). HER2 сверхэкспрессирован в нескольких видах эпителиальных опухолей, включая от 35 до 45% всех аденокарцином поджелудочной железы,

от 25 до 30% рака яичников и от 4 до 83% колоректальных аденокарцином [79,80]. Меченный конъюгат [^{212}Pb]Pb-TCMC-Trastuzumab рассматривается в качестве потенциального препарата для лечения метастатических заболеваний и прошел 1 фазу клинических испытаний [44].

У большинства больных рак яичников диагностируется после того, как заболевание распространилось по брюшной полости. Хотя при оптимальном хирургическом вмешательстве и стандартной химиотерапии обычно наблюдается полный ответ, примерно в половине случаев возникает рецидив, который обычно ограничивается брюшной полостью. Ранее в доклинических исследованиях на мышах с ксенографтами опухолей внутрибрюшинное введение [^{212}Pb]Pb-TCMC-Trastuzumab продемонстрировало терапевтическую активность в отношении различных видов опухолей человека и позволило оценить распределение в брюшной полости [81–83]. Исследования показали длительное удержание [^{212}Pb]Pb-TCMC-Trastuzumab в брюшной полости и отсутствие накопления в нормальных органах. Эти данные позволили перейти к первому клиническому испытанию препарата на пациентах. В ходе исследования препарат вводился с помощью внутрибрюшинного катетера, локализация в нормальных органах, таких как сердце, щитовидная железа или почки не наблюдалась [84].

Проводилось исследование токсичности и дозиметрии при использовании данного радиофармпрепарата на пациентах. Исследование дозиметрии проводилось с учетом вклада дочерних изотопов: ^{212}Bi , ^{212}Po и ^{208}Tl . Исследование на людях подтвердило предсказанную дозиметрию и низкую токсичность. Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями на животных моделях данного препарата, а также на людях с аналогичным конъюгатом другого альфа-излучателя ^{211}At [85].

[^{212}Pb]Pb-TCMSTATE

В настоящее время идет первая фаза клинических испытаний препарата [^{212}Pb]Pb-TCMSTATE (AlphaMedix) [44].

Десять пациентов с метастазирующими нейроэндокринными опухолями получили 4 цикла терапии препаратом $[^{212}\text{Pb}]\text{Pb}$ -ТСМСТАТЕ [86]. Отмечается, что во время увеличения дозы не было отмечено дозолimitирующей токсичности, и ни один пациент не нуждался в отсрочке лечения, снижении или отмене дозы. Контроль с помощью ПЭТ/КТ с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTATATE продемонстрировал явное уменьшение накопления в опухолях (рис. 11). Предварительные результаты показывают эффективность препарата, ожидаются дальнейшие исследования на большей выборке пациентов.

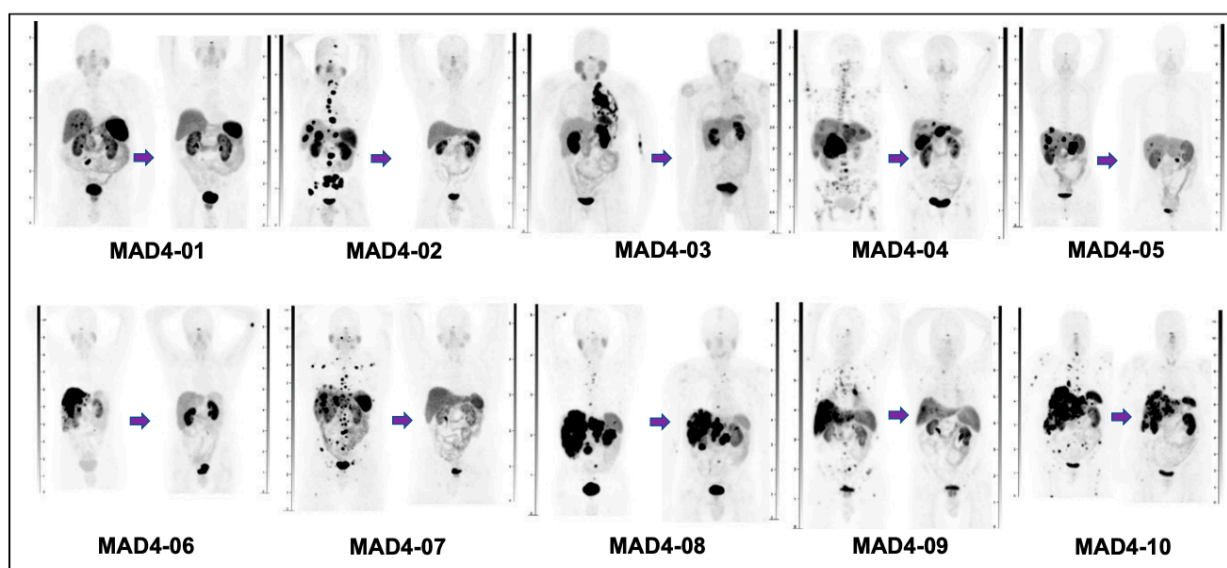


Рис. 11. Изображения сканов ПЭТ/КТ с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTATATE 10 пациентов до и после 4 циклов лечения $[^{212}\text{Pb}]\text{Pb}$ -ТСМСТАТЕ [86].

$[^{212}\text{Pb}]\text{Pb}$ VMT- α -NET, $[^{203}\text{Pb}]\text{Pb}$ VMT- α -NET

В настоящее время идут исследования препаратов с изотопами свинца – $[^{212}\text{Pb}]\text{Pb}$ VMT- α -NET, $[^{203}\text{Pb}]\text{Pb}$ VMT- α -NET. Молекула VMT- α -NET представляет собой модифицированный пептид, нацеленный на рецептор соматостатина, с улучшенной фармакокинетикой и хелатированием $^{203}\text{Pb}/^{212}\text{Pb}$ (рис. 12). Хелатор VMT, являющийся комбинацией DOTA и DOTAM (ТСМС) эффективно хелатирует ^{212}Pb , а также его дочерний ^{212}Bi .

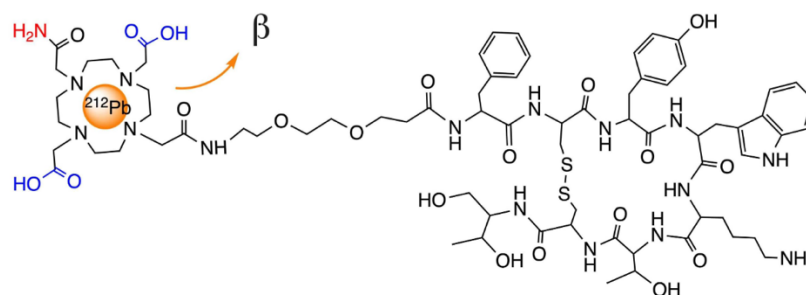


Рис. 12. $[^{212}\text{Pb}]\text{PbVMT-}\alpha\text{-NET}$ ($[^{212}\text{Pb}]\text{Pb-PSC-PEG-TATE}$) [87].

С данным препаратом проведены первые исследования на лабораторных животных, которые показывают, что дочерний радионуклид висмута локализован вместе с материнским ^{212}Pb [87]. Также уже были проведены первые сканирования с использованием диагностического радиоизотопа ^{203}Pb . Сканы ОФЭКТ/КТ, полученные с $[^{203}\text{Pb}]\text{PbVMT-}\alpha\text{-NET}$, сравнивали со сканами ПЭТ/КТ с другим диагностическим препаратом $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NA-DOTATATE}$, оба препарата вводились пациенту с нейроэндокринной опухолью средней кишки на конечной стадии (рис. 13) [88]. Результаты показывают хорошую визуализацию и возможность дальнейшего использования данного препарата для диагностических целей.

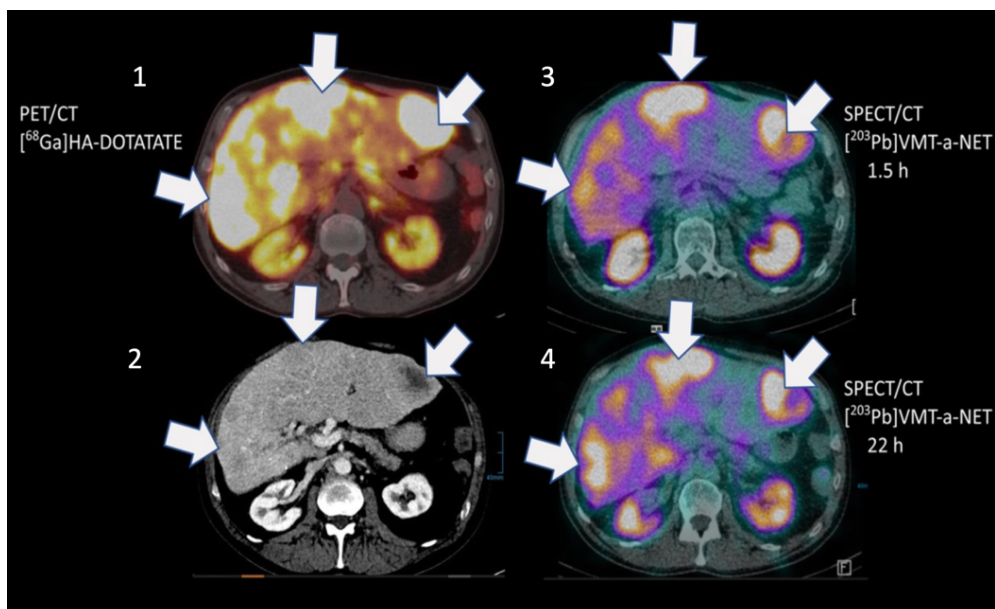


Рис. 13. Сравнение изображений ПЭТ/КТ с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NA-DOTATATE}$ (1), КТ с контрастным усилением (2) и ОФЭКТ/КТ $[^{203}\text{Pb}]\text{Pb-VMT-}\alpha\text{-NET}$ через 1,5 (3) и 22 (4) часа. Стрелки показывают метастазы в печени. [88].

Другие клинические исследования

К клиническим испытаниям готовится еще несколько радиофармпрепаратов со свинцом: ^{212}Pb -pentixather для лечения пациентов с атипичными карциноидами легких и нейроэндокринными карциномами; ^{212}Pb -NG001 и ^{212}Pb -ADVC001 – с метастазирующим раком простаты; ^{212}Pb -VMT01 – с метастатической меланомой [44]. Во всех конъюгатах в качестве хелатирующего агента используется DOTAM (TCMC). В настоящий момент идет набор пациентов, чтобы начать первую стадию исследований. За последние годы интерес к изотопам свинца возрос, а первые пройденные испытания на людях показали эффективность и отсутствие серьезных побочных действий, связанных с использованием больших доз препаратов.

1.3 15-краун-5 и 18-краун-6 эфиры как хелаторы различных катионов для ядерной медицины

Краун-эфиры широко применяются для связывания катионов различных металлов. Как было рассмотрено в предыдущих разделах, краун-эфиры с большими размерами цикла не были широко изучены в качестве хелаторов для медицинского применения изотопов свинца и меди. Однако, комплексообразование этих катионов с такими молекулами изучалось для других областей [89–91]. Было изучено влияние различных функциональных групп на константу комплексообразования (таблица 4). Можно отметить, что константы комплексов с диаза-18-краун-6-эфиром без заместителей практически равны для катионов свинца и меди. Введение дополнительных 2-гидроксипропил групп приводит к повышению константы в случае свинца, а для комплекса меди – к небольшому понижению. Константы комплексов с дипиридиновым краун-эфиром наибольшие из рассматриваемых, причем для катионов меди логарифм константы вырастает более, чем в 2 раза. Это согласуется с закономерностями в ранее рассматриваемых хелаторах, например, для аналогов NOTA, предлагаемыми для потенциального

использования в радиофармпрепаратах с медью: пиридиновые заместители улучшают характеристики комплексообразования [30].

Таблица 4. Константы устойчивости комплексов ML ($M=Pb^{2+}$, Cu^{2+}) с 18-краун-6 эфирами [89]

катион	$\lg\beta(ML)$		
Pb^{2+}	6,8	8,57	11,67
Cu^{2+}	6,1	5,27	13,55

Другой 18-краун-6 эфир нашел применение в ядерной медицине, но не для хелатирования, а для селективного выделения изотопов свинца [64]. Экстракционная смола Pb resin (Triskem) состоит из краун-эфира (рис. 14), разбавленного изодеканолом и нанесенного на инертную подложку.

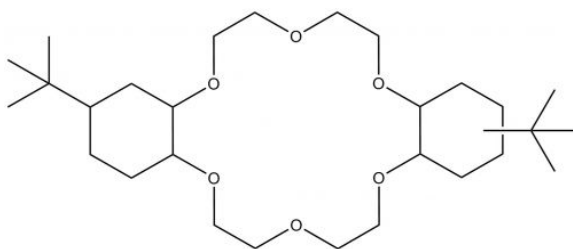


Рис. 14. 18-краун-6 эфир, входящий в состав Pb-resin (Triskem).

Другие применения больших краун-эфиров для меди и свинца не изучены, но они применяются для других катионов. Комплексные соединения технеция применяются для диагностических целей. Существует ряд таких соединений, которые успешно прошли клинические испытания и уже используются в клиниках. Однако, у них есть ряд недостатков, например, высокое накопление в печени, приводящее к нежелательному облучению здоровых тканей. Использование краун-эфиров в сочетании с другими

молекулами предположительно может понизить липофильность препарата и, соответственно, обеспечить быстрое выведение из печени. Пример таких соединений, содержащих краун-эфирные различный размеров (рис. 15), показали улучшенное соотношение накопления в сердце по отношению к печени, что делает использование краун-эфиров в данной области перспективной [92]. Также в данной работе оценивалась токсичность 15-краун-5 и 18-краун-6 эфиров, значение LD50 составило больше 1000 мг/кг при внутривенном введении мышам, что сильно превышает предположительно вводимые дозы препарата.

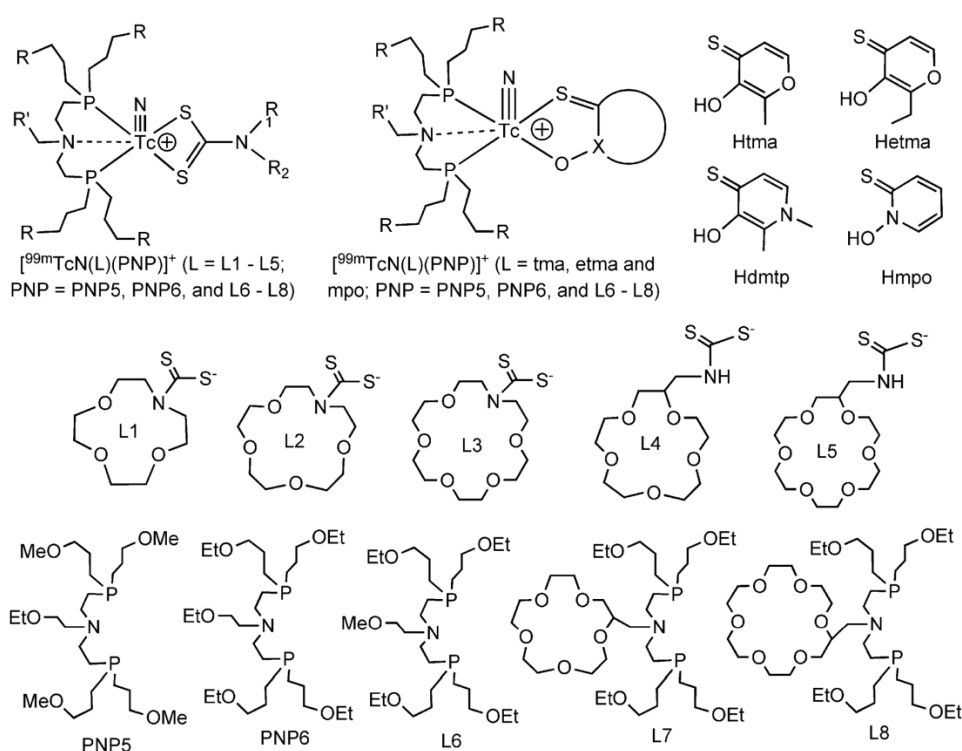


Рис. 15. Состав препаратов технеция с краун эфирами различного размера [92].

Краун-эфирные большего размера (по сравнению с NOTA и DOTA) в качестве хелаторов сейчас приобретают популярность для терапевтических нуклидов. Например, пока единственным известным хелатором, образующим устойчивый в организме комплекс с ^{223}Ra , является тасгора (дипиколилат диаза-18-краун-6) (рис. 16) [93], который проявляет высокое сродство и к другому альфа-излучающему радионуклиду ^{225}Ac [94].

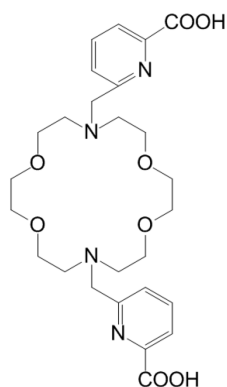


Рис. 16. Хелатор масгора.

Еще один новый хелатор тетраацетат тетрааза-18-краун-6 (crown, рис. 17) продемонстрировал высокие выходы меченя ^{225}Ac при низких концентрациях [95]. Одним из первых аза-18-краун-6 эфиров, разработанных и исследованных для медицинских катионов, а именно ^{225}Ac , был гексааза-18-краун-6 НЕНА (рис. 18). Комплекс $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcHEHA}$ в ранних исследованиях показал высокую стабильность [96], однако меченные конъюгаты НЕНА не демонстрируют высокую устойчивость в организме.

Хелаторы с меньшим размером цикла (рис. 18) – PEPA, TETA, TETPA, характеризуются либо низким выходом меченя, либо низкой устойчивостью *in vivo* образуемых комплексов с Ac^{3+} [97].

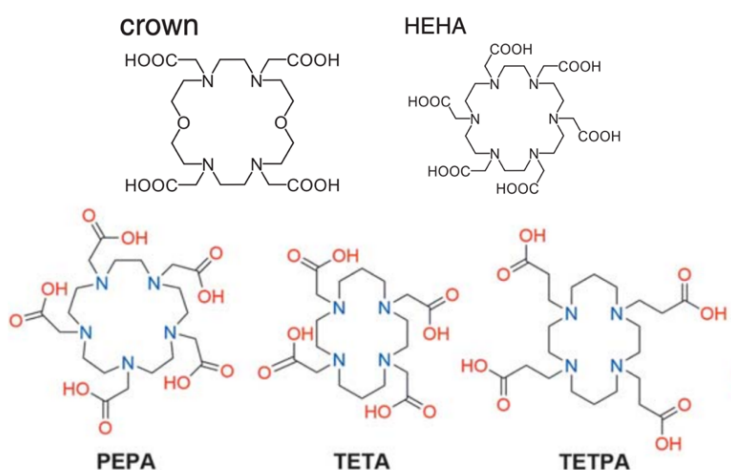


Рис. 17. Хелаторы для актиния.

В настоящее время для связывания катионов с большим ионным радиусом – Ac^{3+} , Bi^{3+} [98], Ra^{2+} , а также лантаноидов [99] широко исследуются именно производные 18-краун-6-эфиров, схожих по строению с масгора.

1.4 Выводы из обзора литературы

Среди изотопов меди и свинца в последние годы интерес с точки зрения применения в радиофармпрепаратах сконцентрирован на ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{203}Pb и ^{212}Pb .

Несмотря на большое количество исследуемых хелаторов для меди, до клинических испытаний в основном доходят препараты на основе DOTA и SAR. Преимуществом первого является возможность варьировать разные радионуклиды, так как данный хелатор подходит для большинства медицинских изотопов металлов. Второй хелатор обладает более высокой скоростью связывания с радионуклидом меди, что упрощает синтез радиофармпрепаратов.

Для радионуклидов свинца эффективным оказался единственный хелатор DOTAM (TCMC), для остальных исследованных наблюдался высокий процент высвобождения дочернего висмута в случае ^{212}Pb . Высвобождение висмута предполагается и для DOTAM, однако, значительно меньше, что связывают с более высокой скоростью образования комплекса – хелатор способен пересвязывать висмут обратно в состав комплекса. Поиск новых эффективных хелаторов для $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ продолжается, так как несмотря на перспективность терапевтических свойств, частичная диссоциация дочернего радионуклида приводит к неблагоприятному воздействию на здоровые клетки организма.

Хелаторы с бóльшим размером макроцикла для медицинских радионуклидов меди и свинца исследованы не были, в настоящее время они исследуются для актиния, висмута и радия.

Катионы свинца имеют промежуточный между актинием и радием размер иона: $R_i(\text{Pb}^{2+})=1,19-1,49 \text{ \AA}$, $R_i(\text{Ac}^{3+})=1,12 \text{ \AA}$, $R_i(\text{Ra}^{2+})=1,48-1,70 \text{ \AA}$, для него также должны подойти хелаторы большого размера. Ионный радиус катионов меди ниже – $R_i(\text{Cu}^{2+})=0,57-0,73 \text{ \AA}$, но так как ^{64}Cu показывает эффективность в диагностическом применении, данный радионуклид может

стать тераностической парой к терапевтическим радионуклидам крупных катионов, если найти подходящие хелаторы, способные эффективно связывать катионы разного размера. Получение биомолекул с одним хелатором, позволяющим эффективно связывать как небольшие, так и более крупные (как правило, терапевтические) катионы различных радионуклидов может позволить упростить производство радиофармпрепаратов за счет синтеза всего одного конъюгата векторной молекулы с хелатором. Используя диагностический радионуклид можно предварительно оценить возможность терапии той или иной меченой биомолекулой в рамках персонализированного подхода, а также дозовую нагрузку на ткани и органы.

Таким образом, 15(18)-азакраун-5(6)-эфир являются мало исследованными объектами в качестве хелаторов для медицинских радионуклидов меди и свинца, и изучение их комплексов представляется важной фундаментальной и прикладной задачей для создания новых радиофармпрепаратов.

2. Экспериментальная часть

2.1 Оборудование и реактивы

Исследуемые лиганды (рис. 1) были синтезированы и охарактеризованы в ИНЭОС РАН в лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем, рук. д.х.н., проф. Фёдорова О.А.

Лиганд DOTA (рис. 2) приобретен у Sigma-Aldrich (США).

Для потенциометрического титрования использовали автотитратор Metrohm Titrino Plus 848.

УФ-спектры были получены на двухлучевом спектрометре UV-1900i Shimadzu.

Измерение радиоактивности проводилось с помощью гамма-спектрометров из сверхчистого германия с коаксиальным детектором ORTEC DSPec50 (Ametek, США) и GR3818 (Canberra Ind., США). Для визуального анализа пластин ТСХ проводилась их автордиография 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.

Эмбриональная бычья сыворотка с тройной стерильной фильтрацией по 0,1 мкм приобретена у фирмы HyClone (Южный Логан, Юта, США).

Азотную кислоту 69% (о.с.ч.) и соляную кислоту 37% (о.с.ч.), сухой гидроксид натрия и нитрат калия (х.ч.) были приобретены у Panreac. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (MilliQ).

2.2 Потенциометрическое и спектрофотометрическое титрование

Потенциометрическое титрование проводили с использованием автотитратора 848 Titrino Plus, оснащенного автобюреткой емкостью 5 мл и комбинированным стеклянным рН-электродом Metrohm (модель 60262100). Комбинированный рН-стеклянный электрод калибровали титрованием HClO_4 раствором NaOH известной концентрации и определяли стандартный

электродный потенциал E_0 с помощью программы GLEE. Для определения констант протонирования лиганда и констант комплексообразования проводили титрование 1 мМ раствора лиганда, затем титрование тех же концентраций лигандов с добавкой эквимольного количества катионов, дополнительно проводились титрования с избытком катиона для отдельных комплексов. При всех титрованиях добавляли 0,01 М раствор HClO_4 для снижения исходного значения рН. Для поддержания постоянной ионной силы в ходе эксперимента также добавляли 0,1 М раствор KNO_3 . Постоянную температуру $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ поддерживали термостатированием в токе азота (для минимизации роли углекислого газа).

Константы протонирования и комплексообразования рассчитывали с помощью программы HyperQuad2008 [100] с использованием констант гидролиза $pK_w = 13,78$, взятых из литературы, ионного произведения воды и предварительно полученного значения E_0 .

Значения p_{Cu} для комплексов рассчитывали при рН 7,4, используя соответствующие значения констант устойчивости и констант протонирования для таких концентраций: $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 1 \text{ мкМ}$ и $[\text{L}]_{\text{tot}} = 9 \text{ мкМ}$.

Для уточнения соотношений форм для комплексов меди проводили спектрофотометрическое титрование в видимой области спектра. К раствору 0,5 мМ $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ постепенно добавляли раствор лиганда до избытка, фиксируя изменения в спектрах.

2.3 Выделение радионуклидов

Никелевую мишень облучали на циклотроне НИИЯФ им. Скобелевца МГУ. ^{64}Cu получали по реакции $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ из металлической никелевой мишени (0,5 г) природного изотопного состава с использованием пучка протонов с энергией 8 МэВ при силе тока 1 μA в течение 3,5 ч. Разделение проводили на Cu-Resin (Triskem) по описанной ранее методике [101]. Эту процедуру разделения на колонке проводили дважды из-за высокого содержания никеля в растворе. Дополнительно перед изменением

концентрации кислоты с 0,01 М HCl до 8 М колонку промывали 2 мл 0,1 М кислоты для отмывки возможных примесей других металлов, содержащихся в мишени. Процесс контролировался с помощью гамма-спектрометрии по пикам 931 кэВ (^{55}Co), 283 кэВ (^{61}Cu) и 1346 кэВ (^{64}Cu). Полученный раствор упаривали досуха и растворяли в 1 мл 0,1 или 0,01 М HCl.

Радиохимическое разделение ^{210}Pb с использованием Sr-смола (Triskem Int. France) проводилось согласно описанной методике [102]. Раствор ^{226}Ra в 0,1 М HNO_3 , загружали на хроматографическую колонку со Sr-смолой, раствор 0,1 М HNO_3 пропускали через колонку до полного смывания радия, затем ^{210}Pb смывали 0,05 М $(\text{NH}_4)_3\text{Citr}$. Разделение ^{210}Pb от ^{226}Ra контролировали с помощью гамма-спектрометрии по пикам 46,5 кэВ (^{210}Pb) и 186,2 кэВ (^{226}Ra). Полученный раствор упаривали и повторно растворяли в 0,1 М HCl.

2.4 Получение и анализ меченых соединений

Для подбора концентрации лигандов готовили растворы, содержащие растворы радиоактивных Cu^{2+} или Pb^{2+} , 0,15 М AcONa и лигандов различных концентраций (от 10^{-6} М до 10^{-3} М).

Выход реакции комплексообразования оценивали с помощью ТСХ сразу же после смешивания компонентов. Для оценки влияния температуры такие же растворы нагревали в термостате при 90°C . Затем на пластины длиной 10 см на высоте 1,5 см наносили 10-20 мкл раствора порциями по 5 мкл, содержащего комплекс или катионы металла в ацетатном буфере, пластину высушивали и помещали в камеру с элюентом, которую закрывали крышкой. Пластина насыщалась элюентом до высоты 9 см, затем пластинку доставали и высушивали. Визуализацию распределения радиоактивности по пластинке осуществляли с помощью цифровой автордиографии (Perkin Elmer Cyclone Plus Phosphor Imager) и программного обеспечения OptiQuant.

Для получения количественных результатов пластинки разрезали на 2 части в соответствии с R_f комплексов и свободных катионов, радиоактивность которых затем измеряли на гамма-спектрометре.

2.5 Устойчивость в биологически значимых средах

Комплексы добавляли к растворам катионов микроэлементов (5 мМ Ca^{2+} и Mg^{2+} , 0,1 мМ Fe^{3+} , Zn^{2+} и Cu^{2+}) и изотоническому раствору 0,15 М NaCl. Через 24 часа инкубации при 37°C измеряли процент связанного в состав комплекса радионуклида методами ТСХ и гамма-спектроскопии.

Для изучения стабильности комплексов в сыворотке крови их растворы радиохимической чистотой >95% смешивали с 9-кратным избытком бычьей сыворотки (HyClone) и инкубировали при 37°C. В определенные моменты времени белки сыворотки осаждали этанолом, центрифугировали и измеряли радиоактивность аликвоты маточного раствора с помощью гамма-спектрометрии. Эксперимент без добавления лиганда проводили в тех же условиях для сравнения. Полученное значение радиоактивности маточного раствора сравнивали с количеством радиоактивности в аликвоте раствора комплекса в сыворотке (исходный раствор). В случае устойчивых комплексов радиоактивность остается в маточном растворе и ее значения равны обнаруженным в аликвотах исходных растворов. В случае неустойчивых комплексов значения ниже и стремятся к значениям, полученным для свободных катионов: в маточном растворе практически не обнаруживается радиоактивность.

Полнота осаждения белков при использовании данной методики была проверена в научной группе ранее с помощью метода Бредфорда [103]. Метод основан на сдвиге спектра поглощения красителя кумасси синий G-250, образующего комплекс с белком, который прямо пропорционален концентрации содержащегося в растворе белка. Разбавленные образцы сыворотки смешивали с реагентом Бредфорда и измеряли оптическое поглощение при $\lambda=595$ нм. Аналогичную процедуру повторяли для образцов

маточных растворов, полученных в эксперименте по определению стабильности после центрифугирования. В результате было показано, что данным методом минимум 99,9% белков осаждаются.

Устойчивость комплексов меди к пересвязыванию супероксиддисмутазой (СОД) проводили по методике, описанной в литературе [104]. Растворы комплексов смешивали с 1000-кратным избытком СОД (1,35 мг СОД с активностью 320000 ед./мг растворяли в 200 мкл 0,9% раствора NaCl). Через 24 часа количество не диссоциированного комплекса и пересвязанных СОД изотопов меди проверяли методом ТСХ, используя аликвоты смесей.

Устойчивость комплексов трех лигандов (DOTA, L2c и L1d) с ^{212}Pb была изучена в четырехкратном избытке сыворотки. Для эксперимента радионуклид ^{212}Pb в HCl, который был получен в Курчатовском комплексе физико-химических технологий НИЦ «Курчатовский институт», смешивали с лигандами с концентрацией 0,5 мМ 0,15 М AcONa. Комплекс с DOTA нагревали 30 минут при 90°C, остальные комплексы смешивались при комнатной температуре и эксперимент начинали в течение нескольких минут после смешивания компонентов. Далее методика эксперимента соответствовала описанной выше.

2.6 Определение структуры комплексов с помощью теоретического (расчетного) метода функционала плотности

Моделирование структур с использованием теории функционала плотности проводилось совместно с НИЛ Интеллектуального химического дизайна кафедры радиохимии Химического факультета МГУ.

Расчеты проводились с использованием теории возмущений Мёллера-Плессе второго порядка с разрешением тождественной аппроксимации [105] (RI-MP2) для решения уравнения Шредингера с дополнительной дисперсионной поправкой D4. Атомные орбитали моделировались с помощью базисного набора def2-tzvp [106]. Все расчеты выполнены в пакете Orca5 [107].

2.7 Спектроскопия протяжённой тонкой структуры рентгеновского поглощения (EXAFS)

Образцы для EXAFS-измерений готовили в водных растворах (200–300 мкл), содержащих 0,005 М комплексов меди при значениях pH: CuL2d – pH8–9, Cu₂L2d – pH4–5.

Измерения рентгеновского поглощения для K-края Cu²⁺ в форме водного проводили на станции структурного материаловедения [108] с использованием оборудования НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия). В качестве источника излучения использовался накопитель с энергией электронного пучка 2,5 ГэВ и током 80–100 мА. Все спектры были сняты в режиме пропускания с использованием монохроматора Si(111) с канальным срезом. Калибровка по энергии проводилась с использованием спектра металлического висмута, с энергией L3 края поглощения 13419 эВ. Данные EXAFS ($\chi_{\text{exp}}(k)$) были проанализированы с использованием пакета анализа данных IFEFFIT [109]. При обработке данных EXAFS использовались стандартные процедуры вычитания фона. Преобразование Фурье (ФП) k^2 -взвешенных EXAFS-функций $\chi_{\text{exp}}(k)$ рассчитывалось в диапазоне волновых чисел фотоэлектронов $k = 3–12,0 \text{ \AA}^{-1}$. Структурные параметры, включая межатомные расстояния (R_i), координационные числа и факторы Дебая–Валлера (σ^2), были найдены путем нелинейной подгонки теоретических спектров (уравнения) к экспериментальным.

2.8 Определение потенциала восстановления меди в комплексе

Данные исследования проводились в Лаборатории Супрамолекулярной химии и нанотехнологий органических материалов на кафедре органической химии Химического факультета МГУ (Моисеева А.А.).

Эквимольный раствор комплекса упаривался, затем NaClO₄ отмывали метанолом (комплекс при этом малорастворим) и снова высушивали.

Циклическая вольтамперометрия проводилась по трехэлектродной схеме: рабочим электродом служили стеклоуглеродный ($d = 2 \text{ мм}$) диск, фоновый

электролит – 0.1 М раствор Bu_4NClO_4 в диметилсульфоксиде, электрод сравнения – $\text{Ag} / \text{AgCl} / \text{KCl}$ (нас.водн), вспомогательный электрод – платиновая пластина. Скорость развертки потенциала составляла 100 мВ/с, измерения проводились в атмосфере аргона. Образцы комплекса CuL_2d предварительно растворяли в дегазированном растворителе.

2.9 Определение липофильности комплексов

Водные растворы с концентрацией 0,5 мМ соответствующих лигандов метили двухзарядными ^{64}Cu и ^{210}Pb при pH 6,5, а затем смешивали с равным объемом н-октанола (Sigma) (500 мкл/500 мкл), полученные образцы встряхивали в шейкере в течение 2 часов при комнатной температуре. После центрифугирования органическую и водную фазы разделяли и измеряли на гамма-спектрометре. IgP рассчитывался следующим образом:

$$\text{IgP} = A(\text{окт}) / A(\text{водн.}),$$

где $A(\text{окт})$ – скорость счета ^{64}Cu или ^{210}Pb в фазе октанола; $A(\text{aq})$ – скорость счета ^{64}Cu или ^{210}Pb в водной фазе.

2.10 Биораспределение в организме мышей

Все перечисленные эксперименты с животными проводились с соблюдением принципов «3R»: «replacement» (замена лабораторных животных в эксперименте на альтернативные модели), «reduction» (уменьшение числа животных), «refinement» (усовершенствование методики эксперимента: обезболивание, обеспечение благополучия животных).

Растворы для инъекций готовились в биологически приемлемых диапазонах pH (6,5) в 0,15 М AcONa , соблюдалась изотоничность, перед введением проверялась радиохимическая чистота препаратов (>95%).

Мыши содержались в комнате содержания грызунов кафедры радиохимии химического факультета МГУ. Для экспериментов использовались животные линии CD-1. Для каждой экспериментальной точки было использовано по 4 мыши.

Для экспериментов в рамках данной работы одобрена заявка в Комиссию по биоэтике МГУ 142-ж «Биораспределение и клиренс меченных ^{64}Cu и ^{210}Pb комплексов азакраун-эфиров» с подробным описанием исследования, оценкой возможной тяжести процедур в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (Перевод Rus-LASA, 2012).

Исследуемые растворы вводились внутривенно через хвостовую вену, после чего животные помещались группами в метаболические камеры с постоянным доступом еды и корма, где проводился сбор продуктов жизнедеятельности – мочи и фекалий. Через 6 часов проводилась эвтаназия в CO_2 камере, органы собирались постмортально и измерялись на гамма-спектрометре с учетом геометрии.

Были измерены радиоактивности аликвот вводимых растворов, на их основе и полученных результатов для каждого органа и биологических жидкостей рассчитывались проценты от введенной дозы, а также проценты от введенной дозы на грамм.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Константы протонирования лигандов

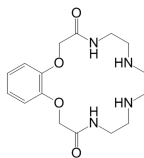
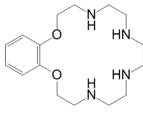
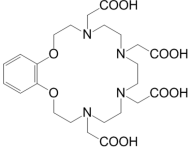
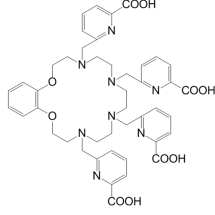
Для изучаемых лигандов методом потенциометрического титрования с последующей обработкой данных в программе Hyperquad были получены константы протонирования (таблицы 5–6), константы для лигандов L1b, L1c и L2c были определены в научной группе ранее [110–112] и представлены для сравнения, так как они впервые рассмотрены в качестве хелаторов для меди (L2c) и свинца (L1b, L1c, L2c), что будет описано в работе далее.

Таблица 5. Константы протонирования (общие (β)/ступенчатые (K)) 15-бензоазакраун-5-эфиров

	L1a	L1b [110]	L1c [111]	L1d	L1e
$\lg\beta(\text{LH})$	$6,7 \pm 0,2$	$9,4 \pm 0,1$	$9,9 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$	$9,3 \pm 0,1$
$\lg\beta(\text{LH}_2)$	–	$17,5 \pm 0,1/8,1$	$17,7 \pm 0,1/7,8$	$14,7 \pm 0,1/6,2$	$17 \pm 0,1/7,7$
$\lg\beta(\text{LH}_3)$	–	–	$21,2 \pm 0,1/3,5$	$19,4 \pm 0,1/4,7$	$20,8 \pm 0,1/3,8$
$\lg\beta(\text{LH}_4)$	–	–	$23,8 \pm 0,2/2,6$	$23,4 \pm 0,1/4$	$22,5 \pm 0,1/1,7$
$\lg\beta(\text{LH}_5)$	–	–	–	$26,7 \pm 0,1/3,3$	–
$\lg\beta(\text{LH}_6)$	–	–	–	$28,9 \pm 0,1/2,2$	–
$\lg\beta(\text{LH}_7)$	–	–	–	$31,3 \pm 0,1/2,4$	–

Таблица 6. Константы протонирования (общие (β)/ступенчатые (K))

18-бензоазакраун-6-эфиров

	L2a	L2b	L2c [112]	L2d
				
$\lg\beta(\text{LH})$	$8,9 \pm 0,3$	$9,5 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,1$
$\lg\beta(\text{LH}_2)$	$14,5 \pm 0,5/5,6$	$18,0 \pm 0,2/8,5$	$21,9 \pm 0,1/10,0$	$16,4 \pm 0,1/7,4$
$\lg\beta(\text{LH}_3)$	–	$23,0 \pm 0,3/5,0$	$30,3 \pm 0,1/8,4$	$21,4 \pm 0,1/5,0$
$\lg\beta(\text{LH}_4)$	–	–	$35,5 \pm 0,1/5,2$	$25,2 \pm 0,1/3,8$
$\lg\beta(\text{LH}_5)$	–	–	$38,1 \pm 0,1/2,6$	$28,5 \pm 0,1/3,3$
$\lg\beta(\text{LH}_6)$	–	–	–	$30,7 \pm 0,2/2,2$
$\lg\beta(\text{LH}_7)$	–	–	–	$33,0 \pm 0,2/2,3$

Для большинства лигандов константы по первой ступени протонирования схожи с константами протонирования аминогрупп у аминокислот, например, глицина ($\lg K(\text{LH})=9,59$), валина ($\lg K(\text{LH})=9,49$), тирозина ($\lg K(\text{LH})=10,1$, аспарагина ($\lg K(\text{LH})=8,72$)) (рис. 18) [113] и относятся к атомам азота в составе макроциклов. Только для тетраацетатного лиганда L2c, по всей видимости, ввиду наличия четырех цвиттер-ионов в пределах одного макроцикла наблюдаются высокие значения константы протонирования по первой ступени.

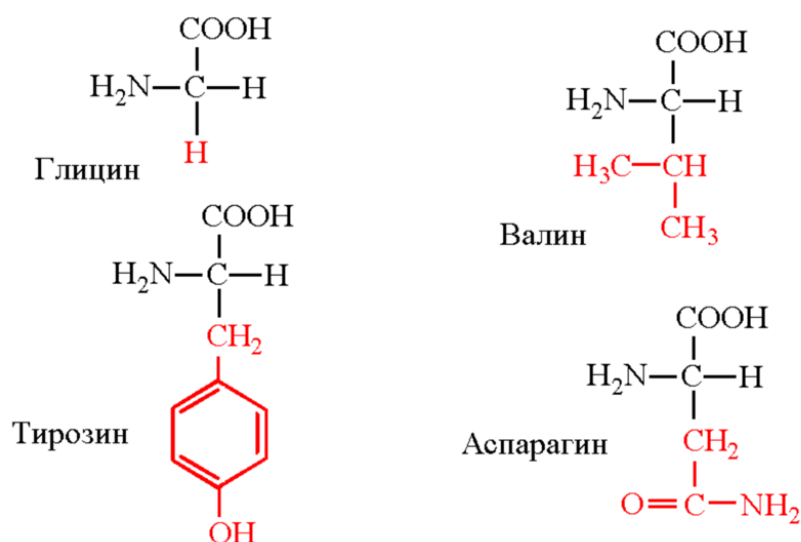


Рис. 18. Некоторые аминокислоты природного происхождения.

Наличие амидного фрагмента в лигандах L1a и L2a снижает общую основность, обеспечиваемую аминами, для них наблюдается протонирование только по 1 и 2 ступени, соответственно. Для лигандов L1a-b и L2a-b последующие константы протонирования также относятся к атомам азота и снижены из-за электростатического отталкивания, возникающего между соседними протонированными аминогруппами.

Исследования протонирования лиганда L1c с тремя ацетатными заместителями показали, что первые две константы относятся к протонированию крайних атомов азота третичных аминов, а протонирование среднего амина в таких лигандах затруднено. Как и в случае с лигандами без ацетатных заместителей (L1b, L2b), константы последующих атомов азота снижены по сравнению с первыми. Третья и четвертая ступенчатые константы значительно ниже и связаны с протонированием карбоксильной группы [111]. Для лиганда L2c так же ранее описано протонирование: первые 4 константы относятся к атомам азота, а последняя – $\lg K(LH_5)=2,6$ к карбоксильной группе [112]. Схема протонирования этих ацетатных лигандов аналогична некоторым известным ациклическим хелаторам, например, ДТРА (рис. 3): $\lg K(LH)=10,4$, $\lg K(LH_2)=8,6$, $\lg K(LH_3)=4,28$, $\lg K(LH_4)=2,6$, $\lg K(LH_5)=2,0$, $\lg K(LH_6)=1,6$, где первые 3 константы относятся к аминам, а остальные – к карбоксильным группам [113].

По сравнению с лигандами с ацетатными заместителями, L1d и L2d с пиколинатными заместителями обладают большим количеством донорных атомов, однако из-за присутствия в структуре более мягких согласно теории ЖМКО пиридиновых атомов азота, основность снижается, и наблюдается более плавное протонирование, чем у аналогичных ацетатных лигандов L1c и L2c. Для двух лигандов в исследуемом диапазоне pH 2–11 удалось обнаружить только 7 констант протонирования, они схожи для обоих лигандов, однако в случае большего 18-краун-6 эфира они незначительно больше. Для известного из литературы лиганда масгора (рис. 16), содержащего 2 пиколинатные группы, первые две константы $\lg K(LH)=7,41$ и $\lg K(LH_2)=6,65$ относят к протонированию аминов макроцикла, последующие $\lg K(LH_3)=3,32$ и $\lg K(LH_4)=2,36$ – к протонированию карбоксильных фрагментов в пиколинатах, а последнюю $\lg K(LH_5)=1,69$ – к пиридиновому фрагменту пиколинатной группы [114]. Для аналога NOTA с 1 пиколинатным и 2 пиридиновыми заместителями – no1pa2py (рис. 3) первые 2 константы $\lg K(LH)=10,61$ и $\lg K(LH_2)=5,25$ также относят к третичным аминам цикла, последующие две к пиколинатным группам $\lg K(LH_3)=3,69$ и $\lg K(LH_4)=1,61$ [115]. Для таких же лигандов с большим количеством пиколинатных групп no2pa1py и no3pa (рис. 3) также характерно протонирование сначала двух аминогрупп макроцикла, затем карбоксильных групп и пиридина [30]. В лигандах L1d и L2d первые 3 константы схожи с константами протонирования аминов, остальные относятся к протонированию пиколинатных фрагментов в аналогичном порядке, как и у вышеперечисленных известных в литературе лигандах – сначала атомы азота в пиридине, затем карбоксильные группы.

При замене средней ацетатной группы лиганда L1c на пиридин в лиганде L1e наблюдается небольшое понижение основности лиганда и - как следствие – уменьшение констант: первые два протона связываются с симметрично расположенными аминогруппами макроцикла, затем аналогично ацетатному лиганду протонируется центральный заместитель, однако в этом случае

образуется положительный заряд на пиридине, за счет этого понижаются остальные константы протонирования. Снижение констант протонирования при замене ацетатной группы на пиридиновую характерно и для других краун-эфиров с разным размером макроциклов [116,117].

3.2 Константы устойчивости комплексов меди

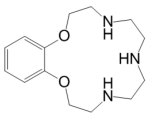
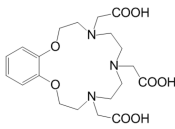
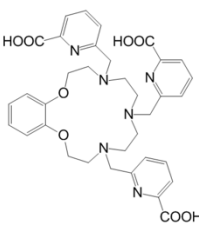
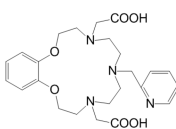
Константы устойчивости комплексов были рассчитаны из данных потенциометрических титрований с использованием ранее полученных констант протонирования лигандов. Константы для комплексов с лигандами L1b, L1c были определены в научной группе ранее [110,111]. Константы представлены в таблицах 7–8, а распределение форм в исследуемом диапазоне pH (от 2 до 11) представлены на рисунках 20–21. Для лигандов с амидными фрагментами L1a и L2a не наблюдалось образование комплексов.

Для 15-бензоазакраун-5-эфиров добавление в структуру ацетатных заместителей при переходе от лиганда L1b к L1c приводит к повышению $\lg\beta(\text{CuL})$ всего на 1 порядок, т.е. наличие дополнительных подвесных групп вносит несущественный вклад в константу устойчивости. Замена одной ацетатной группы на пиридин в лиганде L1e по сравнению с триацетатным лигандом L1c приводит к незначительному понижению на 0,5 порядка, что может быть связано с более низкой основностью лиганда (таблица 3).

Наиболее высокая константа для этого ряда лигандов, а также образование биядерного комплекса, наблюдается для трипиколинатного лиганда L1d, обладающего наибольшим количеством донорных групп. Повышение констант устойчивости при наличии в хелаторах для меди именно пиколинатных групп наблюдается и для других лигандов, например, небольшое возрастание константы устойчивости при добавлении всего одной пиколинатной группы наблюдается и для ряда аналогов циклена (рис. 4): $\lg\beta(\text{Cu-cyclen})=23,4$, а $\lg\beta(\text{Cu-HL1})=24$, при этом замена пиколинатной группы на пиридин снижает константу $\lg\beta(\text{Cu-L3})=21$ [31]. Константы связывания первого и второго катиона в моно- и биядерной формах не эквивалентны, что,

в целом, характерно для комплексообразования с катионами металлов. Присоединение второго катиона менее выгодно, чем первого, например, для H_3PO_3 (рис. 3) $lg\beta(CuL)=16,2$, а $lg\beta(Cu_2L)=21,4$ [30].

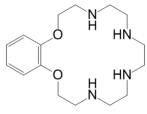
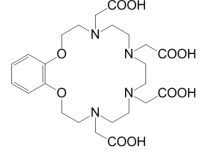
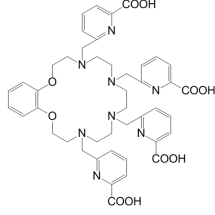
Таблица 7. Константы устойчивости комплексов меди с 15-бензоазакраун-5-эфирами

	L1b [110]	L1c [111]	L1d	L1e
				
$lg\beta(CuLH)$	–	$20,4 \pm 0,1$	$24,2 \pm 0,3$	$20 \pm 0,1$
$lg\beta(CuL)$	$15,6 \pm 0,1$	$16,8 \pm 0,1$	$19,3 \pm 0,3$	$16,3 \pm 0,1$
$lg\beta(CuLOH)$	$23 \pm 0,1$	–	$21,7 \pm 0,3$	$18,6 \pm 0,1$
$lg\beta(CuL(OH)_2)$	$26,8 \pm 0,1$	–	–	–
$lg\beta(Cu_2L)$	–	–	$32,7 \pm 0,4$	–

Увеличение макроцикла и числа донорных групп при переходе к 18-бензоазакраун-6-эфирам для лигандов L2b и L2d (таблица 8) по сравнению с L1b и L1d (таблица 7) приводит к незначительному увеличению констант формы CuL , в то время как для тетраацетатного L2c константа повышается на 8 порядков по сравнению с меньшим триацетатным L1c аналогом.

Для тетраацетатного лиганда L2c, как и для пиколинатных лигандов L1d и L2d, наблюдается образование биядерного комплекса, которого не было в случае триацетатного L1c. Это может быть связано с увеличением донорных атомов с 6 до 8, что позволяет создавать необходимое координационное окружение уже для двух катионов меди, для которых характерны КЧ от 4 до 6.

Таблица 8. Константы устойчивости комплексов меди с
18-бензоазакраун-6-эфирами

	L2b 	L2c 	L2d 
$\lg\beta(\text{CuLH}_2)$	–	–	$30,0 \pm 0,1$
$\lg\beta(\text{CuLH})$	$22,2 \pm 0,1$	$31,8 \pm 0,2$	$26,2 \pm 0,1$
$\lg\beta(\text{CuL})$	$16,4 \pm 0,3$	$24,8 \pm 0,3$	$20,4 \pm 0,1$
$\lg\beta(\text{CuLOH})$	$23,3 \pm 0,3$	$27,8 \pm 0,3$	$22,9 \pm 0,2$
$\lg\beta(\text{CuL}(\text{OH})_2)$	$27,1 \pm 0,4$	–	–
$\lg\beta(\text{CuL}(\text{OH})_3)$	$29,8 \pm 0,3$	–	–
$\lg\beta(\text{Cu}_2\text{LH})$	–	$35,6 \pm 0,3$	–
$\lg\beta(\text{Cu}_2\text{L})$	–	$33,2 \pm 0,2$	$33,5 \pm 0,2$

Наличие биядерных комплексов подтверждалось

спектрофотометрическим титрованием в видимой области: при постепенном добавлении к раствору меди раствора лиганда наблюдалось неравномерное увеличение оптической плотности, перегибы наблюдались, когда достигалось соотношение форм $\text{Cu}^{2+}:\text{L}$ 1:1 и 2:1 (рис. 19). Дополнительно проводились потенциометрические титрования в двукратном избытке катиона. Данные титрования позволили уточнить значения констант форм 2:1, так как в данном соотношении данные формы присутствовали в большом количестве, в отличие от титрований в эквимолярном соотношении. Также при таких титрованиях не наблюдали образования нерастворимых форм гидроксидов металлов при повышении pH выше 5-6, что косвенно подтверждает связывание в комплекс избытка катиона свыше эквимолярного лиганду количества.

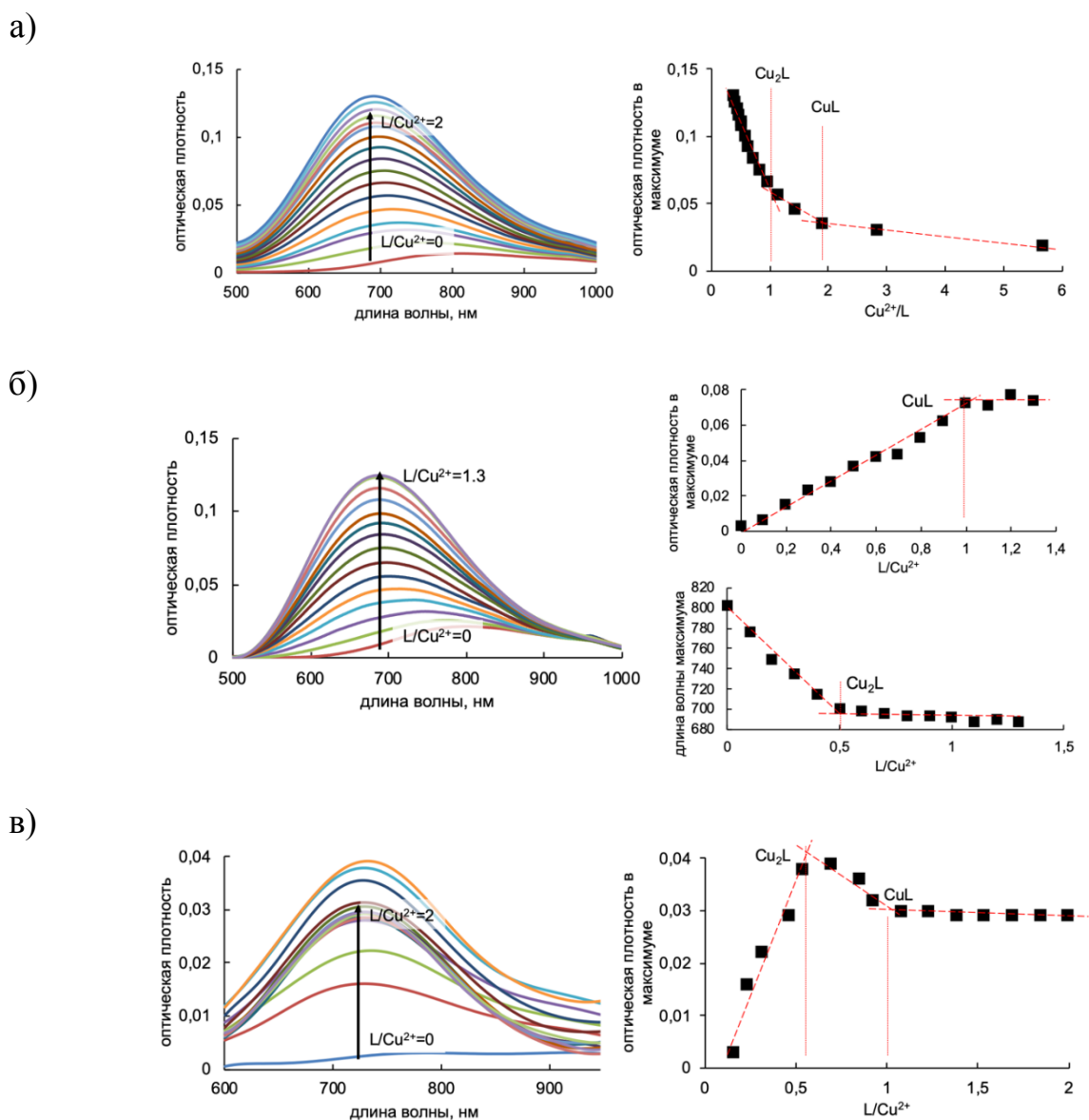


Рис. 19. Спектрофотометрическое титрование Cu^{2+} с L1d(a), L2c(б) и L2d(в): спектры и изменение поглощения и длины волны максимального поглощения от соотношения количеств катиона и лиганда.

Из графиков распределения форм для комплексов меди (при эквимолярном соотношении) можно заметить, что введение в структуру дополнительных подвесных групп приводит к увеличению количества протонированных форм комплекса и уменьшению числа гидроксокомплексов. Биядерные формы присутствуют преимущественно при низких значениях pH, что характерно для комплексов меди с пиколиновыми лигандами, например, поЗра (рис. 3) [30].

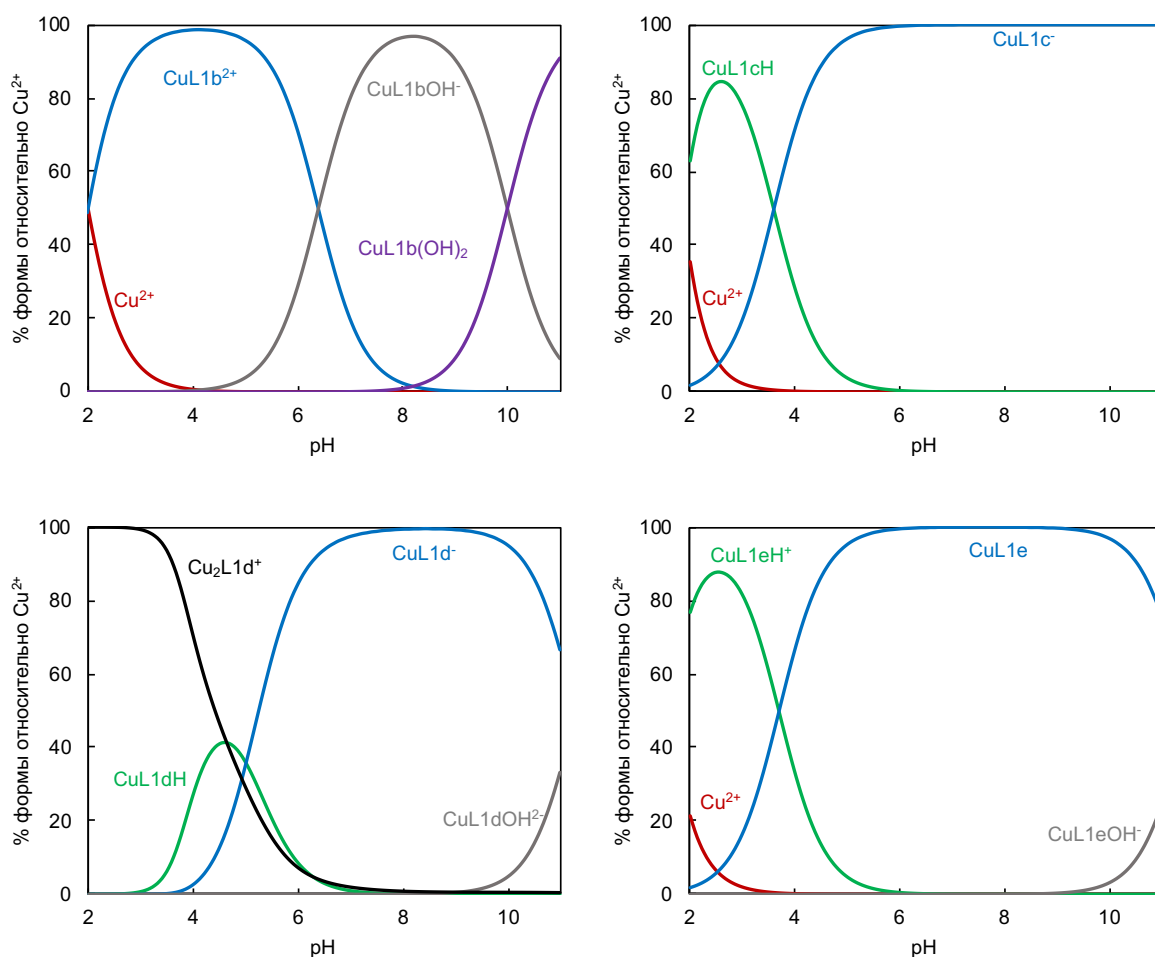


Рис. 20. Распределение форм комплексов меди с 15-бензоазакраун-5-эфирами ($c(L)=c(Cu^{2+})=0,001$ M).

Увеличение размера макроцикла в случае перехода от L1b к L2b приводит к добавлению и протонированной, и гидроксо-форм комплекса. Почти для всех лигандов в близком к биологическому диапазоне pH 4–8 комплекс преимущественно присутствует в депротонированной и монопротонированной формах, исключения – лиганды без подвесных групп L1b, L2b, для них уже в этом диапазоне происходит образование гидроксокомплексов.

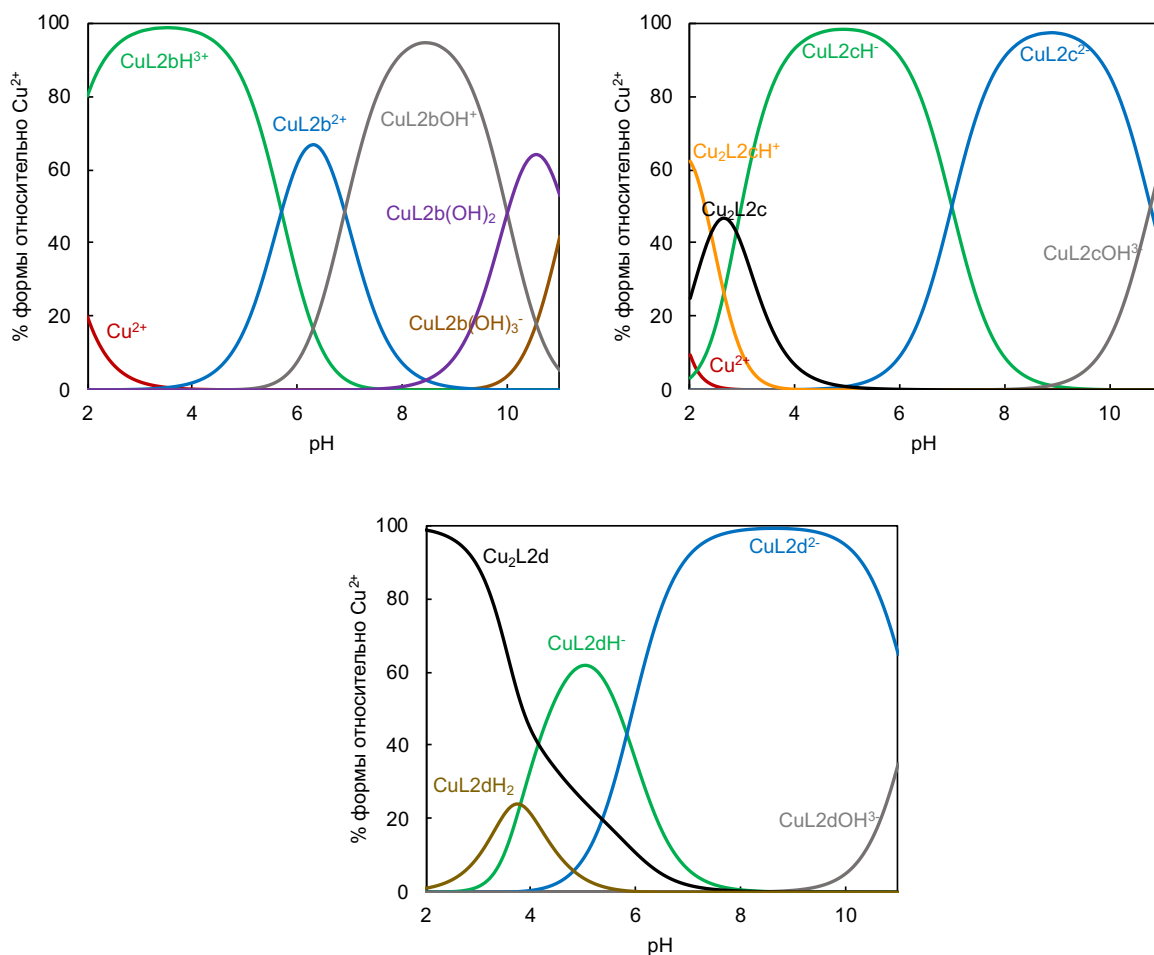


Рис. 21. Распределение форм комплексов меди с 18-бензоазакраун-6-эфирами ($c(L)=c(Cu^{2+})=0,001$ М).

При двукратном избытке катиона меди комплексы с лигандами, способными образовывать биядерные комплексы, находятся в основном в форме Cu_2L в широком диапазоне pH-10, причем для пиколинатных лигандов L1d и L2d гидроксоформа начинает образовываться только при $pH > 11$, для тетраацетатного L2c можно наблюдать образование остальных форм в небольшом количестве (рис. 22). Это может быть связано с более высокими константами для моноядерных форм в случае L2c, в то время как константы для биядерной формы практически равны для трех комплексов (таблицы 7–8).

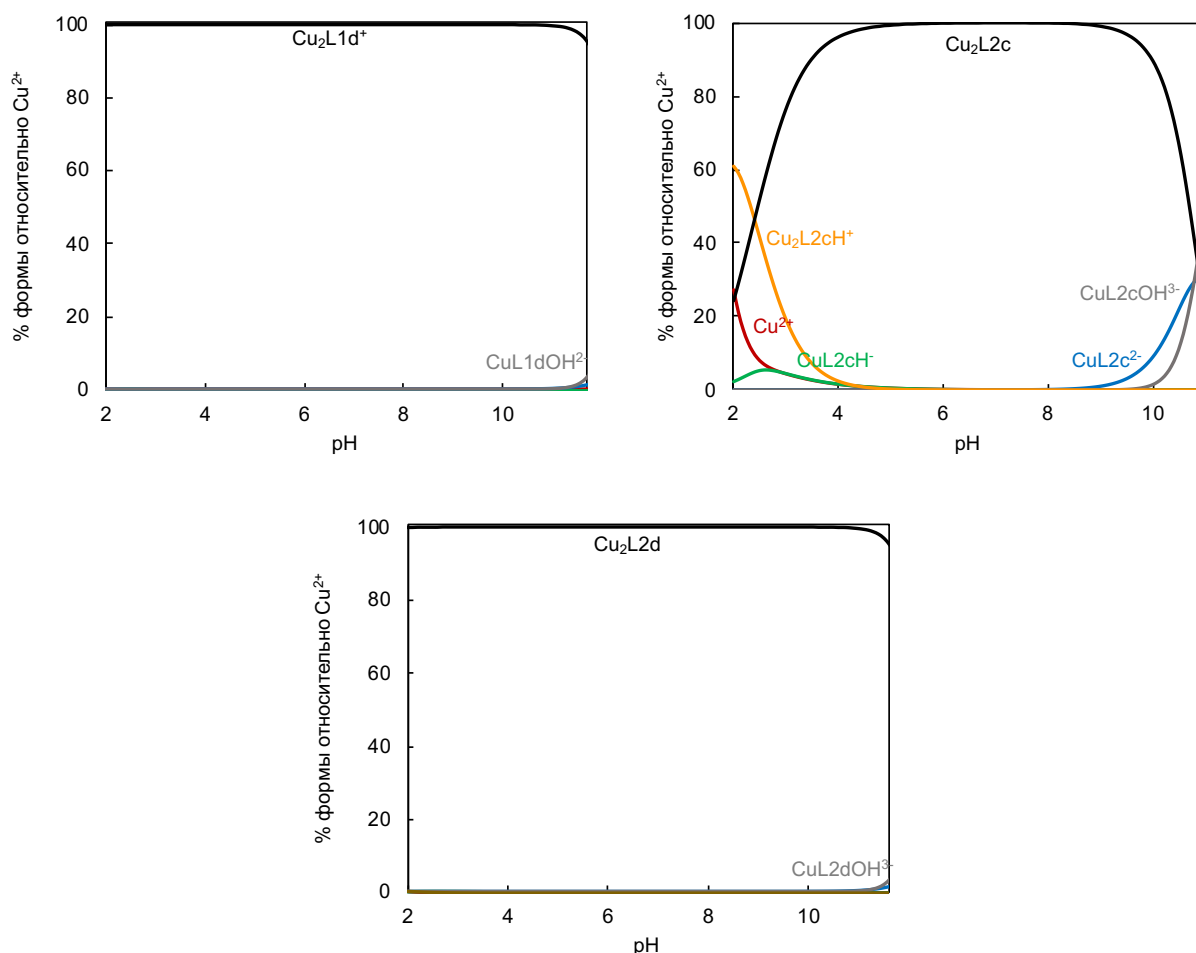


Рис. 22. Распределение форм комплексов меди с бензоазакраун-эфирами при избытке меди ($c(L) = 0,001 \text{ M}$, $c(\text{Cu}^{2+}) = 0,002 \text{ M}$).

3.3 Константы устойчивости комплексов свинца

Константы комплексообразования с катионами свинца также определялись методом потенциометрического титрования. Полученные результаты представлены в таблицах 9–10, а распределения форм комплексов в исследуемом диапазоне pH – на рисунках 23–24. В отличие от катионов меди только для одного лиганда наблюдалось образование биядерного комплекса с Pb^{2+} ввиду большего размера катиона.

При титровании бисамидных лигандов L1a и L2a с катионами свинца образовывался осадок и достоверно определить константы не удалось.

Таблица 9. Константы устойчивости комплексов свинца с 15-бензоазакраун-5-эфирами

	L1a	L1b	L1c	L1d	L1e
$\lg\beta(\text{PbLH}_3)$	—	—	—	$27,1 \pm 0,1$	—
$\lg\beta(\text{PbLH}_2)$	—	—	—	$24,4 \pm 0,1$	—
$\lg\beta(\text{PbLH})$	—	—	$20,1 \pm 0,1$	$20,9 \pm 0,1$	$18,6 \pm 0,1$
$\lg\beta(\text{PbL})$	—	$9,4 \pm 0,1$	$17,2 \pm 0,1$	$16,1 \pm 0,1$	$16,6 \pm 0,1$
$\lg\beta(\text{PbLOH})$	—	—	$23,1 \pm 0,1$	$18,6 \pm 0,1$	$20,2 \pm 0,2$
$\lg\beta(\text{PbL}(\text{OH})_2)$	—	—	$26,3 \pm 0,1$	—	$22,4 \pm 0,2$

Таблица 10. Константы устойчивости комплексов свинца с

18-бензоазакраун-6-эфирами

	L2a	L2b	L2c	L2d
$\lg\beta(\text{Pb}_2\text{L})$	—	—	—	$33,3 \pm 0,5$
$\lg\beta(\text{PbLH}_2)$	—	—	$34,0 \pm 0,1$	$31,8 \pm 0,3$
$\lg\beta(\text{PbLH})$	—	—	$29,7 \pm 0,1$	$28,1 \pm 0,3$
$\lg\beta(\text{PbL})$	—	$10,8 \pm 0,2$	$21,6 \pm 0,1$	$21,3 \pm 0,3$
$\lg\beta(\text{PbLOH})$	—	—	$24,7 \pm 0,1$	$24,4 \pm 0,3$
$\lg\beta(\text{PbL}(\text{OH})_2)$	—	—	—	—

Для L1b и L2b также наблюдалось выпадение осадка при повышении рН, однако при низких значениях рН эти лиганды способны связывать Pb^{2+} с небольшой разницей в значениях констант устойчивости, что соответствует их близкой основности. Такое различие в способности к комплексообразования

можно объяснить меньшей основностью лигандов L1-2a (таблица 9) по сравнению с L1-2b (таблица 10), меньшим количеством донорных аминогрупп и большей жесткостью структуры макроцикла, которую трудно подстроить и обеспечить необходимую координационную сферу для катионов свинца. При этом полученные константы для L1-2b невысоки, данные лиганды также в полной мере не способны создать эффективную координацию катионов свинца (КЧ 6–12).

Наибольшими константами обладают комплексы с бензоазакраун-эфирами, содержащими только ацетатные заместители – L1c и L2c, а также с лигандом с наибольшим количеством донорных атомов – L2d. Замена одной ацетатной группы на пиридиновую в лиганде L1e, как и в случае меди, приводит к небольшому понижению константы, что связано с более низкими константами протонирования лиганда. Снижение на один порядок по сравнению с триацетатным L1c наблюдается и для пиколинатного лиганда L1d, что аналогично можно связать с меньшей основностью лиганда, а также с отдалением карбоксильных групп за счет пиридиновых фрагментов, что может вызывать стерические затруднения при координации катионов свинца.

Наличие четвертой ацетатной группы в лиганде L2c позволяет создать наиболее полное координационное окружение для катионов свинца и получить комплекс с наибольшей константой устойчивости. В случае тетрапиколинатного лиганда L2d по сравнению с L1d увеличение макроцикла и дополнительный заместитель создают достаточное количество донорных центров для двух катионов свинца. Дополнительно проводилось титрование этого лиганда в присутствии двукратного избытка катионов свинца, константа биядерного комплекса была уточнена.

Для пиколинатных (L1d, L2d) и тетраацетатного (L2c) лигандов наблюдалось большее по сравнению с триацетатным (L1c) и диацетат-монопиридиновым (L1e) количество протонированных форм лиганда (таблицы 5–6). В связи с этим при низких значениях pH для комплексов с первыми можно наблюдать последовательное образование нескольких

протонированных форм комплексов, а депротонированная форма PbL присутствует в нейтральных и щелочных областях (рис. 23–24). Для вторых образуется только монопротонированная форма ввиду меньшего количества протонируемых центров, по этой причине уже при небольшом повышении pH образуется депротонированная форма, а в щелочной области образуются несколько гидроксоформ комплексов.

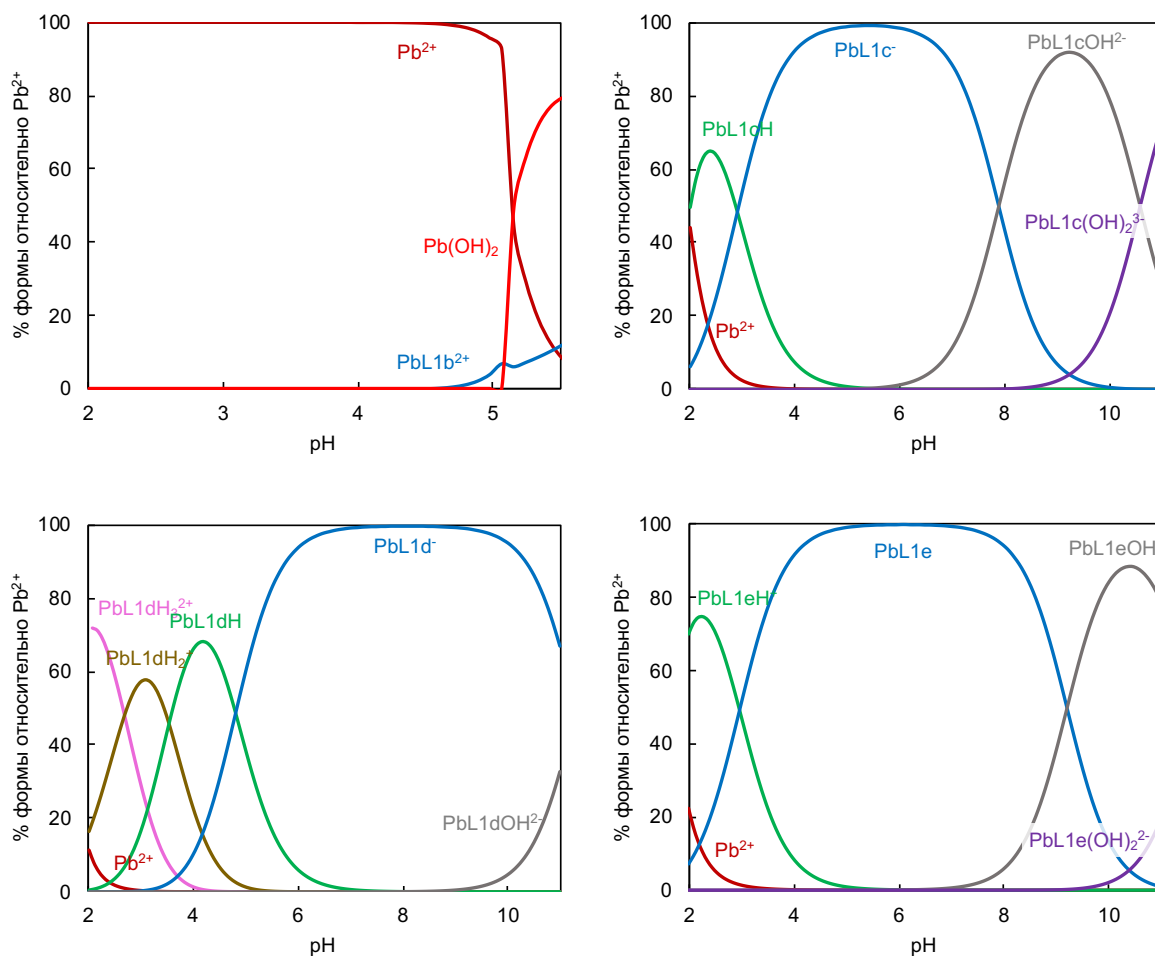


Рис. 23. Распределение форм комплексов свинца с 15-бензоазакраун-5-эфирами ($c(L)=c(Cu^{2+})=0,001$ M).

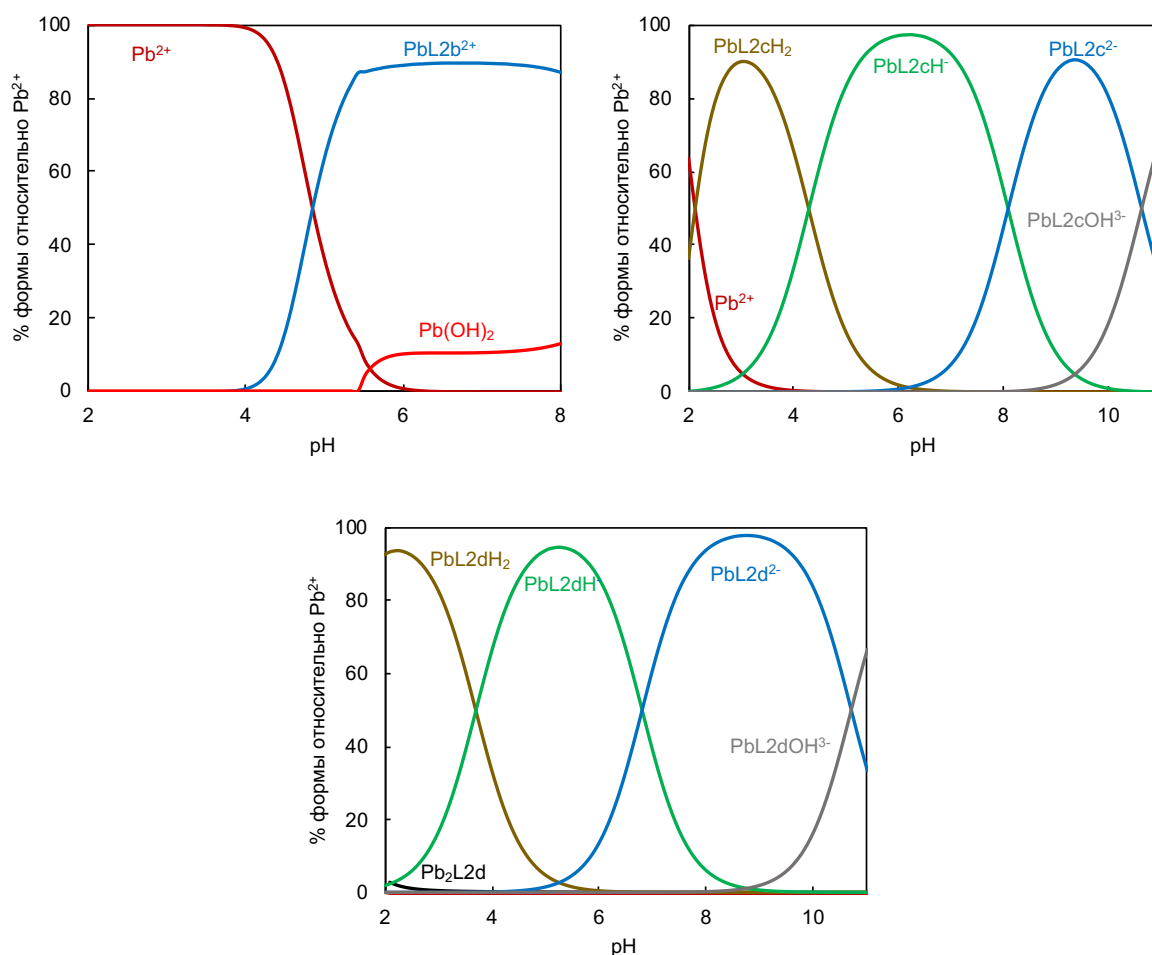


Рис. 24. Распределение форм комплексов свинца с 18-бензоазакраун-6-эфирами ($c(L)=c(Cu^{2+})=0,001\text{ M}$).

3.4 Определение условий образования меченых комплексов

Для дальнейших экспериментов не рассматривался комплекс меди с лигандами L1b и L1c, которые были изучены в научной группе ранее и не продемонстрировали прочного связывания Cu^{2+} , а также комплексы с лигандами, которые не образовывали комплекс и для которых наблюдалось образование осадка при повышении pH. Комплекс меди с лигандом L2b без заместителей, несмотря на относительно высокую константу устойчивости, также не рассматривался, так как ранее аналогичный комплекс $CuL1b$ показал низкую стабильность с изотопами меди [110]. Вероятно, данный тип лигандов без дополнительных подвесных групп (L1b, L2b) не способен образовывать стабильные комплексы с медью.

Для получения комплексов использовали изотопы ^{64}Cu и ^{210}Pb . Изотопы меди $^{61,64}\text{Cu}$ выделяли из облученной никелевой мишени по описанной ранее методике [101]. Так как в растворе присутствовало большое количество никеля, методику разделения проводили последовательно несколько раз для дополнительной очистки от примесей. Из-за возможных примесей других металлов, которые могут влиять в дальнейшем на комплексообразование, перед изменением концентрации кислоты с 0,01 М HCl (элюирование Ni^{2+}) до 8 М (элюирование Cu^{2+}) колонку дополнительно промывали 2 мл 0,1 М кислоты. Радиохимическое выделение ^{210}Pb проводилось согласно описанной методике [102] без внесения изменений.

Для анализа выхода реакции комплексообразования использовали метод ТСХ. Для комплексов были протестированы следующие элюенты в различных соотношениях:

- 0,9 % NaCl/10мМ NaOH
- 20 % NH_4Cl /MeOH
- 10% AcONa/MeOH
- 0,1% TFA в $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$
- $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$

В качестве неподвижной фазы исследовали силикагель и целлюлозу на алюминиевой подложке, а также бумагу, импрегнированную силикагелем iTLC-SG (Agilent).

Критерием выбора подходящей системы было минимальное время, необходимое на анализ, а также оптимальное разделение свободных катионов и комплекса. Фактор удерживания R_f является основной величиной, используемой для описания положения формы вещества на хроматограмме, и рассчитывается как соотношение расстояния от старта до центра пятна (z) к расстоянию от старта до фронта (l) [118]:

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

Подобранные системы, а также значения R_f представлены в таблице 11.

Таблица 11. ТСХ системы для исследуемых комплексов

Комплекс	Элюент	Неподвижная фаза	R _f
[⁶⁴ Cu]CuL1d	0,9 % NaCl/10мМ NaOH = 1/1	целлюлоза на алюминиевой подложке	1
[⁶⁴ Cu]CuL2d			1
все комплексы с ²¹⁰ Pb			1
[⁶⁴ Cu]CuL1e			1
⁶⁴ Cu]CuL2c	20 % NH ₄ Cl/ CH ₃ OH = 1/1	силикагель на алюминиевой подложке	0,4
[⁶⁴ Cu]CuL2c			0,3

Важно отметить, что анализ проводился сразу после смешивания компонентов – образование комплексов происходило быстро при комнатной температуре (20-25°C). Во всех случаях нагрев до 90°C и/или выдерживание раствора в течение получаса при повышенной или комнатной температуре не влияли на выход реакции. Это является значительным преимуществом перед известными хелаторами, описанными в литературе. Применение исследуемых лигандов может существенно упростить методику получения радиофармпрепаратов: синтез меченных соединений в течение нескольких минут без необходимости дополнительной техники для нагрева, который к тому же может влиять на биологические молекулы, используемые в диагностике и терапии.

Растворы готовили в 0,15 М AcONa при pH 6,5. Ацетат широко используется в клинической практике, выбранная концентрация и значение pH применяются в исследованиях хелаторов для потенциального применения в области ядерной медицины.

В радиофармпрепаратах используются ультраразбавленные растворы радионуклида, поэтому получение меченого соединения проводят в мольном недостатке катиона радионуклида, кроме того, раствор содержит добавочные компоненты. Важно подобрать концентрации, при которых лиганд связывает

максимальное количество радионуклида, чтобы минимизировать присутствие свободных (не связанных со специфичной биомолекулой) катионов радионуклидов в вводимом в пациента растворе. Также нельзя использовать большие концентрации лигандов, так как это приведет к снижению удельной активности препарата. В связи с этими факторами была исследована зависимость выхода реакции комплексообразования от концентрации лиганда. Полученные результаты для комплексов с медью и свинцом представлены в таблицах 12–13.

Таблица 12. Зависимость степени мечения комплексов меди в зависимости от концентрации лиганда $c(L)$

$c(L)$, мМ	$[^{64}\text{Cu}]\text{CuL1d}$	$[^{64}\text{Cu}]\text{CuL1e}$	$[^{64}\text{Cu}]\text{CuL2c}$	$[^{64}\text{Cu}]\text{CuL2d}$
0,005	–	–	–	49 ± 3
0,01	8 ± 2	34 ± 2	10 ± 1	95 ± 6
0,05	70 ± 4	96 ± 3	81 ± 5	98 ± 3
0,1	96 ± 5	99 ± 2	97 ± 5	100 ± 6
0,5	98 ± 4	92 ± 8	97 ± 4	100 ± 7
1	96 ± 6	97 ± 9	97 ± 4	99 ± 5

Таблица 13. Зависимость степени мечения комплексов свинца в зависимости от концентрации лиганда $c(L)$

$c(L)$, мМ	$[^{210}\text{Pb}]\text{PbL1c}$	$[^{210}\text{Pb}]\text{PbL1d}$	$[^{210}\text{Pb}]\text{PbL1e}$	$[^{210}\text{Pb}]\text{PbL2c}$	$[^{210}\text{Pb}]\text{PbL2d}$
0,01	9 ± 1	84 ± 3	62 ± 1	74 ± 1	5 ± 1
0,02	70 ± 3	92 ± 4	73 ± 3	93 ± 3	9 ± 1
0,05	92 ± 4	97 ± 3	95 ± 3	–	95 ± 2
0,1	100 ± 4	98 ± 4	100 ± 4	100 ± 3	100 ± 3
0,2	100 ± 4	–	95 ± 4	100 ± 4	–
0,5	100 ± 4	–	100 ± 3	–	100 ± 3
1	–	99 ± 4	100 ± 4	100 ± 3	100 ± 4

Меченные комплексы меди со всеми лигандами образуются с высоким выходом (>90%) при концентрации от 0,1 мМ. При этом наибольшие концентрации для связывания меди требуются для трипиколинатного бензоазакраун-эфира L1d (0,1 мМ), наименьшая концентрация – на порядок ниже 0,01 мМ, необходима для тетрапиколинатного бензоазакраун-эфира L2d. Данные результаты могут быть улучшены при более тщательной очистке используемых растворов и посуды, так как примеси различных катионов могут мешать связыванию радионуклидов. В таком случае высокая селективность к катионам меди лиганда L2d может объясняться высоким значением величины pCu ($-\lg[Cu]_{free}$), которое служит для сравнения сродства лигандов к катиону, несмотря на их различную основность. Эта величина определяет термодинамически возможное количество свободного катиона, находящегося в равновесии с лигандом при определенных условиях. Для выполнения этого расчета используют приближенные к реальности концентрации катиона и лиганда при синтезе РФП, т.е. избыток лиганда, а также околонеутральное биологически приемлемое значение pH 7,4. Использование этой величины позволяет нивелировать разную основность лигандов, что вносит вклад в значение $\lg\beta$, и проводить более корректное сравнение комплексов. Например, самая высокая константа устойчивости наблюдалась для CuL2c (таблица 8), однако значение pCu для него оказалось почти на два порядка ниже, чем для CuL2d – 17,7 и 19,3 соответственно. Примечательно, что для известных комплексов меди для CuDOTA (рис. 2) ($\lg\beta=22,2$), и для CuTETA (рис. 2) ($\lg\beta=21,9$) [119] pCu составляет 16,8, тогда как для комплексов с монопиколинатными лигандами CuDO1PA (HL1, рис. 4) ($\lg\beta=24,0$) и CuTE1PA (HL2, рис. 4) ($\lg\beta=25,5$) (рис. 26) [31] pCu составляет 20,0 и 19,5. соответственно. В совокупности литературные и новые данные подтверждают сродство Cu^{2+} к пиколинатсодержащим лигандам.

Из комплексов свинца наименьшая концентрация (0,02 мМ) необходима для получения комплексов с трипиколинатным и тетраацетатным

бензоазакраун-эфирами L1d и L2c с выходом >90%, что обуславливает их высокую селективность к катионам свинца.

3.5 Оценка стабильности комплексов *in vitro*

Для оценки устойчивости комплексов *in vitro* моделируются условия, которые могут привести к диссоциации комплексов в условиях живого организма. Большое по сравнению с количеством радионуклида содержание различных катионов микроэлементов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) может привести к пересвязыванию их лигандом и высвобождению радионуклида из комплекса. Другим путем разрушения целостности комплекса может быть перехелатирование радионуклида белками, содержащимися в крови. Поэтому на следующем этапе проводились эксперименты по изучению стабильности меченных соединений в различных модельных средах биологического значения.

3.5.1 Исследование стабильности комплексов меди

В избытке катионов микроэлементов (5 мМ Ca^{2+} , Mg^{2+} , 0,1 мМ Fe^{3+} , Zn^{2+} , и Cu^{2+}), а также в изотоническом растворе 0,15 М NaCl все исследуемые комплексы меди оказались устойчивыми в течение суток.

Помимо выше обозначенного катионы меди в организме могут также связываться супероксиддисмутазой (СОД) – одним из основных белков в организме, который связывает и восстанавливает катионы меди. Этот фермент наблюдается главным образом в печени, а также в почках и в эритроцитах. Семейство дисмутаз меди и цинка CuZnSOD обладает потенциалом восстановления E_{red} в диапазоне от +0,310 до +0,420 В (относительно нормального водородного электрода) [120]. Следовательно, один из потенциальных способов диссоциации комплексов меди *in vivo* – транхелатирование молекулой СОД.

В тысячекратном избытке СОД в течение часа все исследуемые комплексы устойчивы, однако через сутки инкубирования целостность

комплекса сохраняется только с пиколиновыми лигандами L1d и L2d (рис. 25).

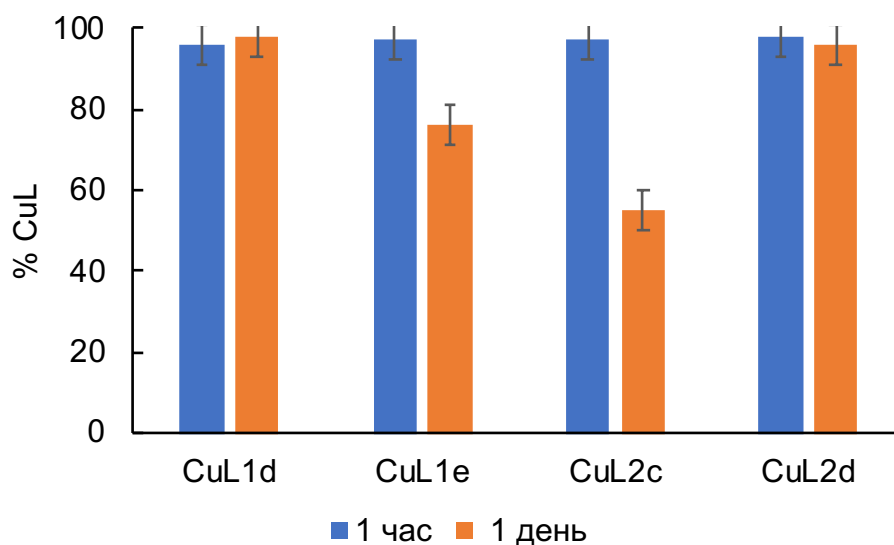


Рис. 25. Устойчивость комплексов меди с исследуемыми лигандами в избытке СОД.

Устойчивость комплексов изучалась в избытке сывороточных белков при инкубировании при 37°C в течение суток (рис. 26). Для сравнения проводился blank-эксперимент (в тех же условиях раствор радионуклида в 0,15М АсОНa без добавления лигандов) – более 90% радионуклида были связаны с сывороточными белками в течение всего эксперимента.

Комплексы с трипиколиновым лигандом L1d и тетраацетатным L2c диссоциируют с первых минут эксперимента, а через 4 часа инкубирования в сыворотке около 80% меди оказываются связанными с сывороточными белками. Комплекс с L1e (1 пиридин, 2 ацетата) устойчив в течение 4 часов, однако через сутки треть радионуклида перехелатируется белками. Комплекс с тетрапиколиновым лигандом L2d не диссоциирует в течение наблюдаемого времени.

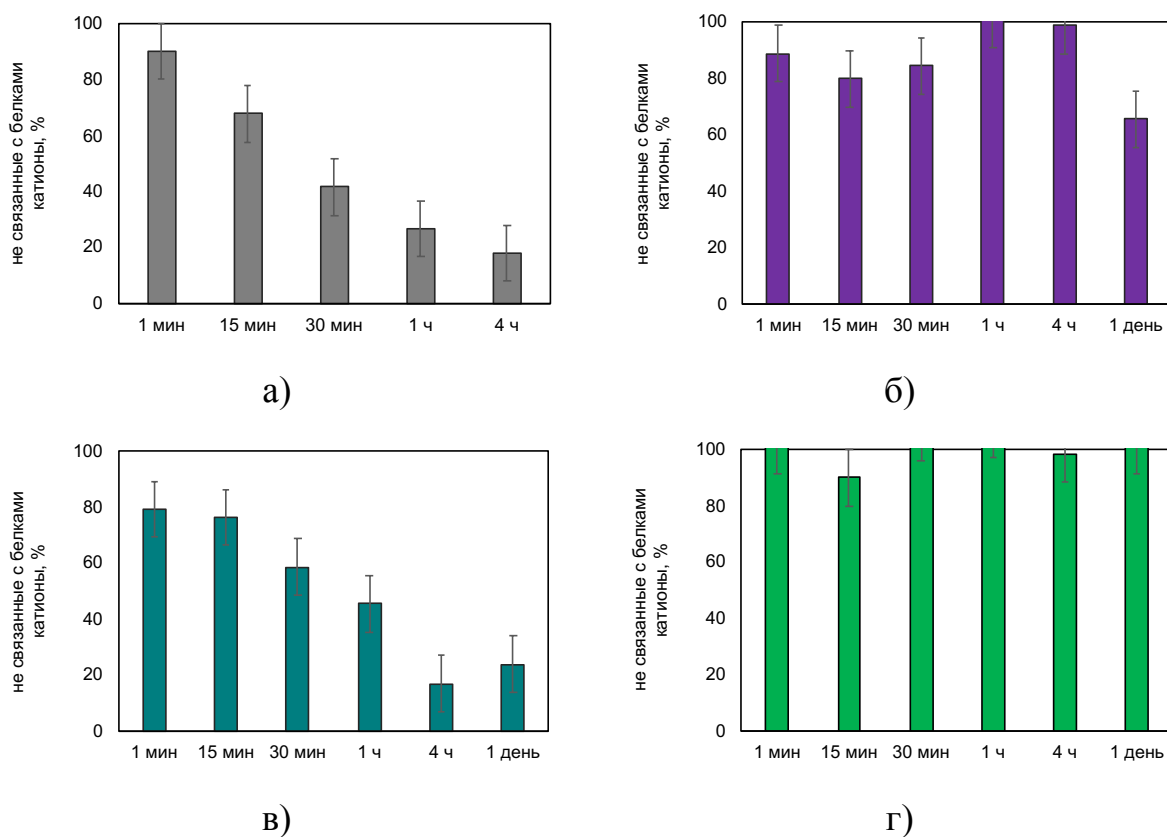


Рис. 26. Устойчивость комплексов меди с лигандами L1d (а), L1e (б), L2c (в), L2d (г) в среде сывороточных белков.

Таким образом, при замене ацетатных групп на пиколинатные при переходе от L2c к L2d наличие дополнительных пиридиновых фрагментов в координационном окружении катиона меди вносит положительный вклад в прочность образуемых комплексов и, соответственно, приводит к повышению устойчивости в среде конкурирующих хелатирующих агентов. Замедленное высвобождение радионуклида из комплекса наблюдается для комплекса с лигандом L1e, содержащим пиридин. Однако, несмотря на наличие трех пиколинатных групп в лиганде L1d, радионуклид меди так же быстро перехелатируется из комплекса сывороточными белками, как и из комплекса с тетраацетатным L2c. Возможным объяснением этого может быть различие в геометрии и координационном окружении комплексов.

3.5.2 Исследование структуры комплексов меди

Для комплексов меди с L1d, лигандами L1e, L2c и L2d были смоделированы структуры с использованием теории функционала плотности (рис. 27).

Согласно полученным длинам межатомных расстояний (таблица 14), донорные атомы в триацетатном лиганде L1d в большей степени удалены от атома меди по сравнению с другими комплексами, что может обуславливать большую доступность катиона к перехелатированию в присутствии избытка сывороточных белков.

Таблица 14. Межатомные расстояния (Å) Cu²⁺ в координационном окружении их комплексов согласно оптимизированным геометриям

CuL1d	CuL1e	CuL2c	CuL2d
Cu–N 2,3	Cu–N 2,1	Cu–N 2,3	Cu–N 2,2
Cu–N 2,2	Cu–N 2,1	Cu–N 2,2	Cu–N 2,0
Cu–N 2,2	Cu–N 2,1	Cu–O 2,0	Cu–N 1,9
Cu–O 2,0	Cu–N 2,4	Cu–O 2,0	Cu–N 2,2
Cu–O 2,3	Cu–O 2,3	Cu–O 2,0	Cu–O 2,0
	Cu–O 1,9		

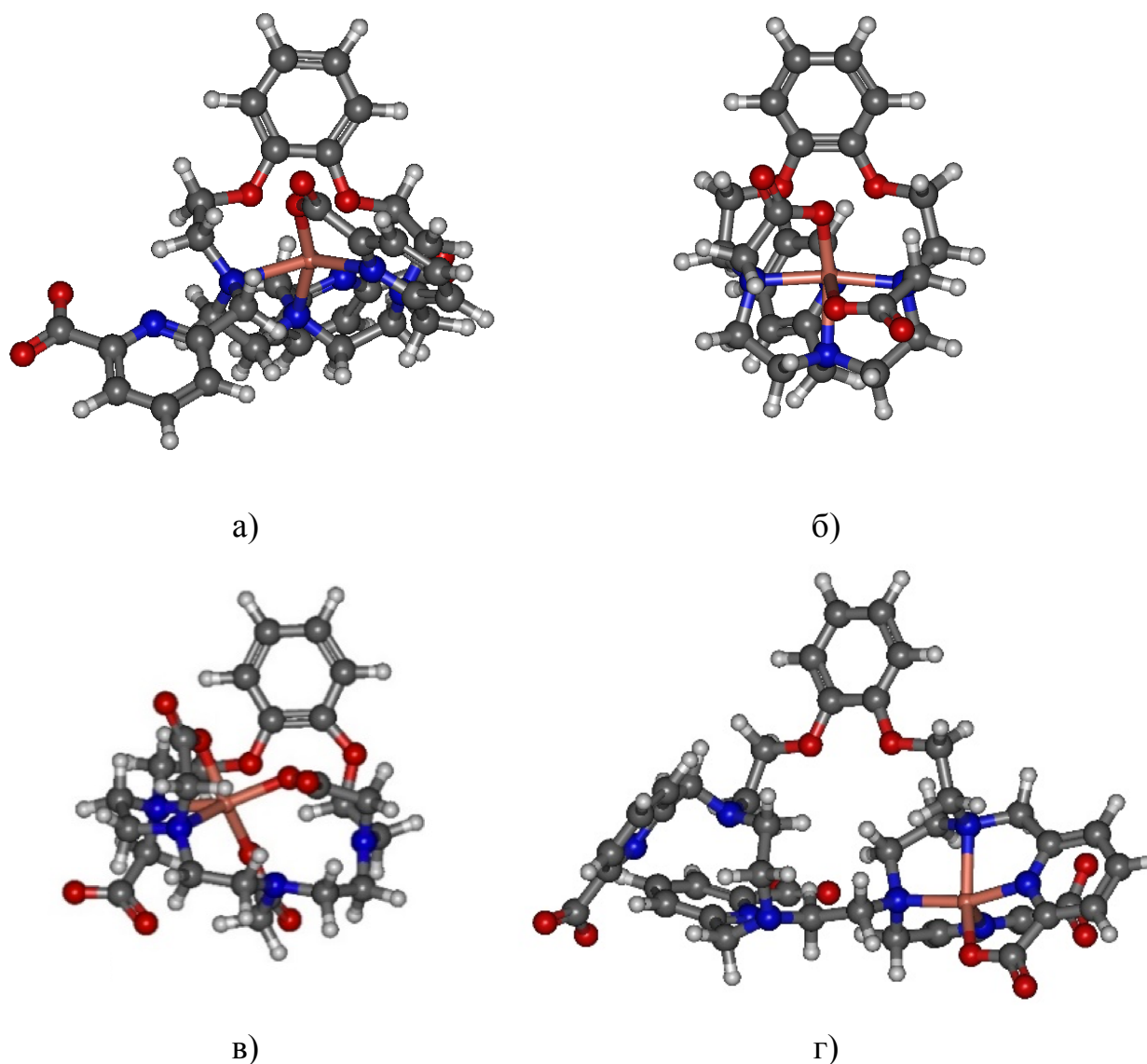


Рис. 27. Оптимизированные геометрии комплексов CuL1d (а), CuL1e (б), CuL2c (в) и CuL2d (г).

На рисунке 28 показаны только те атомы лигандов, которые участвуют в координации катионов меди. Координационные полиэдры во всех случаях представляют собой искаженные октаэдры. Можно заметить, что комплексы, в которых в координации меди участвует большее количество атомов азота, оказались устойчивее в сыворотке (CuL1e, CuL2d), что еще раз подтверждает, что добавление в структуру лигандов дополнительных пиридиновых и пиколилатных фрагментов повышает устойчивость получаемых комплексов.

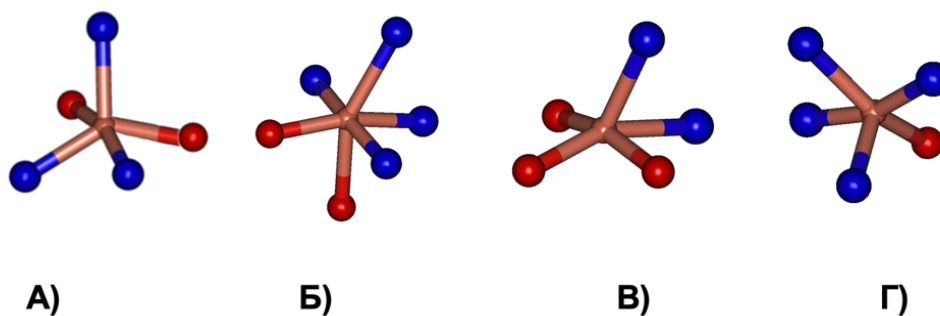


Рис. 28. Атомы азота и кислорода, координирующие медь в комплексах CuL1d (а), CuL1e (б), CuL2c (в) и CuL2d (г).

Стоит отметить, что в самом устойчивом комплексе с лигандом CuL2d атом меди симметрично координирован снаружи макроцикла, в то время как остальные лиганды координируют медь внутри. Подобная координация снаружи наблюдалась и для комплекса с трипиколинатным лигандом 9-краун-3 позра [121], и по-видимому, может обеспечить более прочное хелатирование катиона меди.

Для подтверждения такой координации вне макроцикла использовали спектроскопию протяжённой тонкой структуры рентгеновского поглощения. Изучались моно- и биядерный (рис. 29) комплексы тетраацетатного лиганда с медью. В биядерном комплексе две позиции меди различаются набором координированных донорных атомов: 4 азота + 1 кислород и 3 азота + 2 кислорода. В первом случае медь координируется двумя макроциклическими аминогруппами, двумя пиридиновыми атомами азота и одним карбоксильным кислородом, а во втором связана с одной макроциклической аминогруппой, двумя пиридиновыми атомами азота и двумя карбоксильными атомами кислорода из двух пиколинатных подвесных групп. Для моноядерного комплекса оценивалось обе из этих координаций, предпочтительна оказалась координация 4 азота+1 кислород (разница составила 12 ккал/моль).

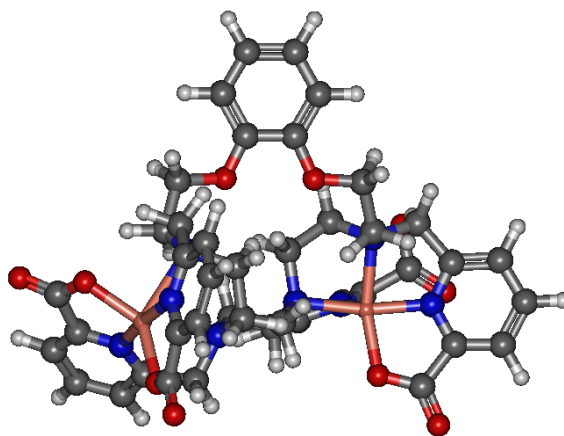


Рис. 29. Оптимизированная геометрия комплекса $\text{Cu}_2\text{L2d}$.

Рассчитанные геометрии сравнивались с координационными числами и окружением, полученными из измерений EXAFS (рис. 30, таблица 15). Спектры показывают, что CuL2d и $\text{Cu}_2\text{L2d}$ имеют схожую форму, что соответствует рассчитанным структурам соответствующих комплексов.

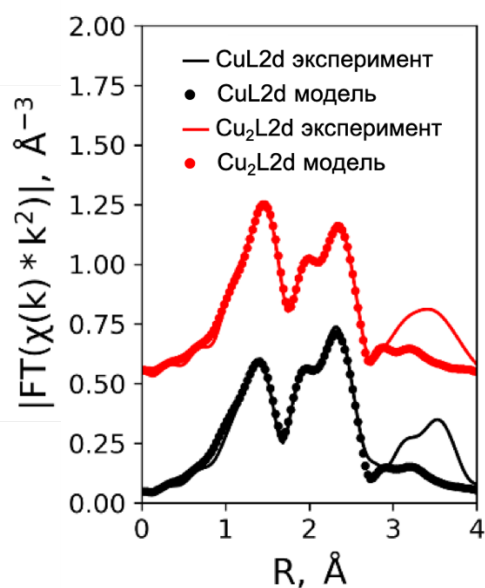


Рис. 30. EXAFS-спектры комплексов меди CuL2d и $\text{Cu}_2\text{L2d}$.

Близкие атомные коэффициенты рассеяния С, N и O не позволяют различить атомы в локальном окружении атома меди. Согласно обработке данных, ближайшее расстояние 1,9-2 Å соответствует координации в экваториальной плоскости Cu^{2+} в обоих комплексах. Расстояние 2,2 Å может быть связано с аксиальной координацией донорным атомом лиганда и симметричной координацией в соответствии с расчетными данными: ближайшие расстояния к экваториальному N/O составляют 1,9-2,1 Å и к

аксиальному 2,2 Å (таблица 16, рис. 31). По-видимому, близкое окружение координирующих атомов в комплексах не позволяет зафиксировать дальнедействующее окружение, обуславливающее высокие значения КЧ при 2,86 Å как для моно-, так и для биядерных комплексов.

Таблица 15. Межатомные расстояния и координационные числа, полученные из спектров EXAFS комплексов меди CuL2d и Cu₂L2d.

	Координационная оболочка	R, Å	Координационное число	σ^2 , Å ²
CuL2d	Cu-C/N/O	1,94	2,9	0,008
	Cu- C/N/O	2,19	2,4	0,008
	Cu- C/N/O	2,86	9,7	0,008
Cu₂L2d	Cu- C/N/O	1,97	3,3	0,007
	Cu- C/N/O	2,20	1,9	0,007
	Cu- C/N/O	2,86	7,1	0,007

Таблица 16. Межатомные расстояния выборочных атомов в расчетных геометриях комплексов меди с лигандом L2d

	CuL2d	Cu₂L2d
N1	Cu1-2,15	Cu1-2,11
N2	Cu1-2,02	Cu1-2,04
N3	Cu1-1,91	Cu1-1,89
N4	Cu1-2,19(акс)	Cu1-2,22(акс)
N7		Cu2-3,09
N8		Cu2-2,43(акс)
N9		Cu2-1,96
N10		Cu2-1,95
O5	Cu1-2,00	Cu1-1,96
O11		Cu2-2,02
O12		Cu2-1,99
Cu-Cu		8,40

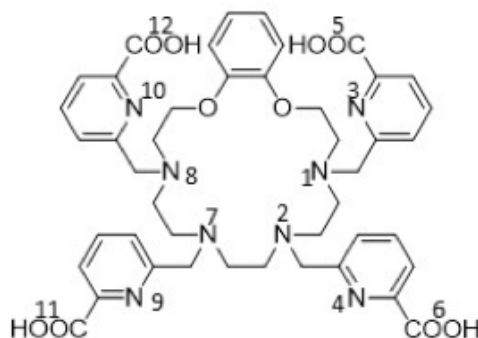


Рис. 31. Нумерация атомов в лиганде L2d, используемая в таблице 16.

Примечательно, что при обработке спектров рентгеновского поглощения биядерного комплекса не обнаруживаются признаки наличия расстояния Cu–Cu. Это согласуется с большим расстоянием между катионами в расчетной геометрии биядерного комплекса (8,4 Å).

3.5.3 Окислительно-восстановительное поведение Cu^{2+} в составе комплекса с L2d

Еще одним вероятным путем деметаллизации комплексов меди в организме является восстановление до Cu^+ с последующим высвобождением катиона. Предполагается, что для сохранения целостности комплекса потенциал восстановления Cu^{2+} в комплексе должен быть ниже порога для биовосстановителей, который составляет -0,4 В относительно нормального водородного электрода (-0,59 В относительно Ag/AgCl/KCl(насыщен.)) [122]. Так как только комплекс $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{CuL2d}$ оказался устойчивым в биологически значимых средах, было проведено исследование данного комплекса с помощью циклической вольтамперометрии (рис. 32). Данный метод основан на измерении электрического тока в системе при наложении изменяющегося во времени напряжения. Особенностью является циклическое изменение напряжения, то есть сначала вещество окисляется на аноде, а потом восстанавливается на катоде.

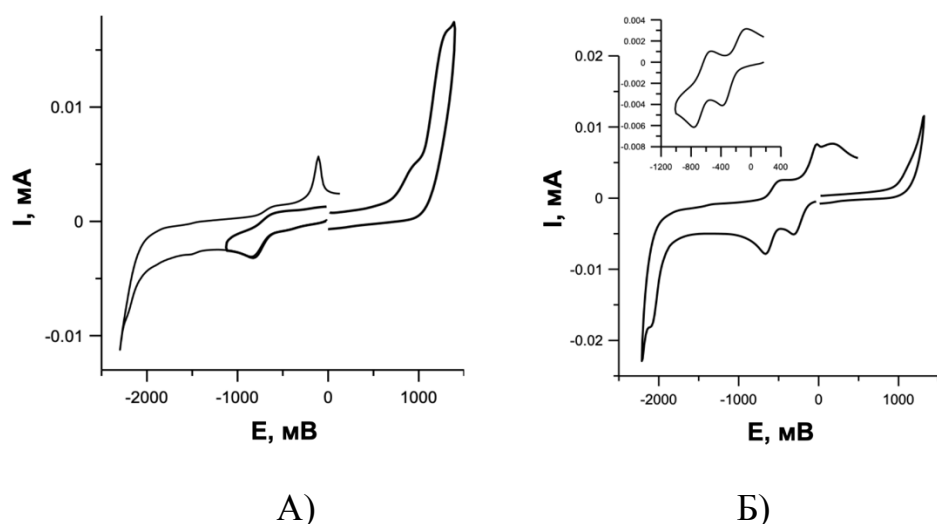


Рис. 32. Циклические вольтамперограммы комплексов CuL2d(A) и Cu₂L2d(B).

Как упоминалось ранее (раздел 3.4), в радиофармпрепаратах используются ультраразбавленные растворы радионуклида, а лиганд находится в избытке. При таком соотношении в растворе присутствуют только моноядерные формы комплексов (рис. 33), в отличие от эквимольного соотношения компонентов (рис. 21).

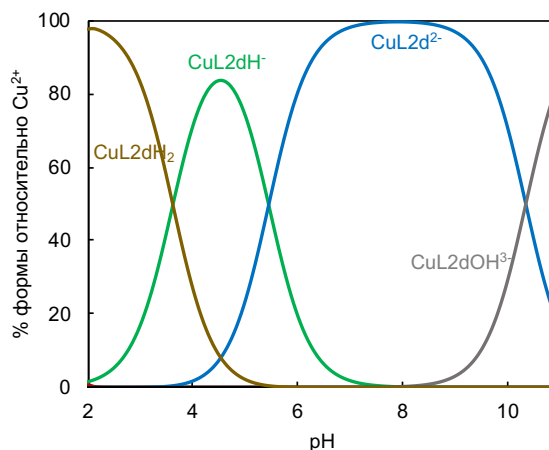


Рис. 33. Распределение форм комплекса меди с избытком тетрапиколинатного лиганда L2d ($c(L) = 0,001 \text{ M}$, $c(\text{Cu}^{2+}) = 10^{-8} \text{ M}$).

Полученное значение восстановления $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ в составе моноядерного комплекса -0.83 V (рис. 34А) ниже, чем порог для восстановителей в организме. Учитывая, что в растворах с радионуклидом комплекс находится именно в таких формах, *in vivo* CuL2d должен быть устойчив к процессам

восстановления меди. Кроме того, при достижении потенциала $-1,0$ В при обратном сканировании не наблюдается пик десорбции, что может свидетельствовать об устойчивости комплекса, содержащего одновалентную медь, а необратимость катодного пика может свидетельствовать об изменении координации восстановленной меди.

В биядерном комплексе $\text{Cu}_2\text{L}2\text{d}$ атомы меди координируются разным набором донорных атомов лиганда, что было показано и при расчете геометрии комплекса, они восстанавливаются последовательно и квазиобратимо, каждый с участием одного электрона (рис. 34Б). Квазиобратимость катодных пиков, по-видимому, указывает на изменение координации меди в случае Cu^+ . В процессе реокисления при обратном сканировании потенциала комплекс возвращается в исходное состояние.

3.5.4 Исследование стабильности комплексов свинца

Комплексы свинца изучались в избытке катионов микроэлементов (5 мМ Ca^{2+} и Mg^{2+} , $0,1$ мМ Fe^{3+} , Zn^{2+} , and Cu^{2+}), а также в изотоническом растворе $0,15$ М NaCl и оказались устойчивыми в течение суток.

В избытке сывороточных белков (рис. 34) все комплексы оказались устойчивыми в течение наблюдаемого времени – 2 суток.

Полученные результаты значительно отличаются от описанных ранее для комплексов меди. Для двухзарядных катионов меди и свинца разница между константами связывания с бычьим сывороточным альбумином (BSA) незначительна: $\lg\beta(\text{Cu-BSA})=4,3$ [123] и $\lg\beta(\text{Pb-BSA})=4,7$ [124], что не должно являться причиной такой разницы в стабильности комплексов в сыворотке. По-видимому, большой размер макроцикла действительно более предпочтителен для образования стабильных *in vitro* комплексов с более крупными катионами свинца, чем меди. Отсутствие перехелатирования в сыворотке говорит о том, что все исследуемые лиганды могут быть исследованы в дальнейшем с точки зрения возможности применения в диагностических препаратах на основе ^{203}Pb .

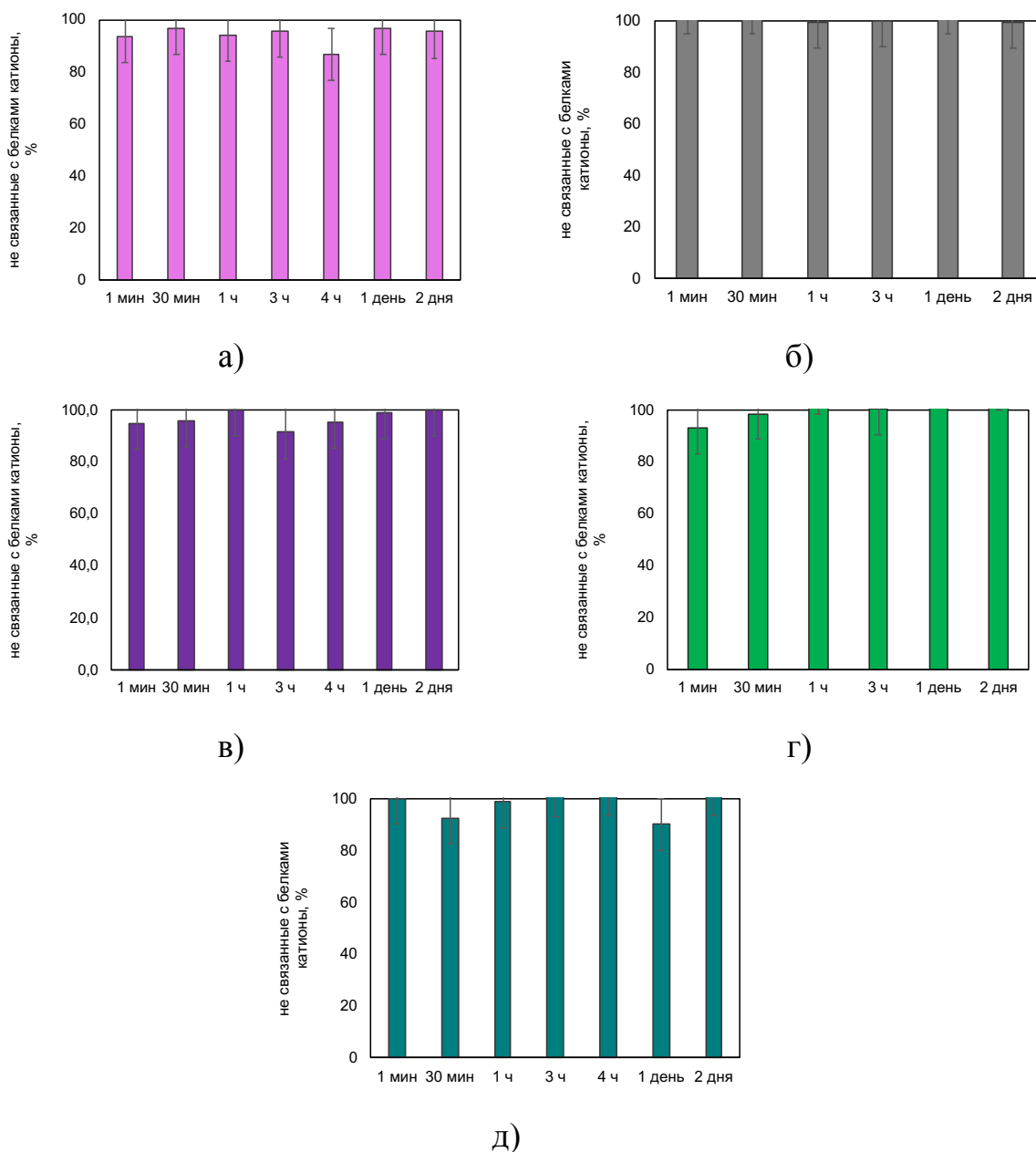


Рис. 34. Устойчивость комплексов свинца с лигандами L1c (а), L1d (б), L1e (в), L2c (г), L2d (д) в среде сывороточных белков.

Согласно описанному в литературном обзоре (раздел 1.2.2) для терапевтических целей с применением ^{212}Pb важно учитывать устойчивость не только с катионами свинца, но и висмута. Лиганд L2c был исследован в научной группе и с катионом висмута – комплекс BiL2c оказался устойчивым *in vitro*, а также инертным к перехелатированию в организме лабораторных мышей [112]. Именно для этого лиганда, а также для трипиколинатного L1d требовались наименьшие концентрации лигандов для получения меченных комплексов со свинцом. Эти лиганды представляют наибольший интерес для

дальнейшего исследования, поэтому были получены их комплексы с радионуклидами ^{212}Pb , находящимися в равновесии с ^{212}Bi . Для сравнения был получен комплекс с известным хелатором DOTA (рис. 8), для этого реакционную смесь, содержащую DOTA и $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$, выдерживали в течение 30 минут при 90°C , а PbL1d и PbL2c были получены при комнатной температуре и исследовались сразу после смешивания реагентов.

Устойчивость комплексов с DOTA, L2c и L1d изучалась в избытке сывороточных белков при 37°C , оценивалось количество свинца и висмута, связанного с белками сыворотки. При таком проведении эксперимента, после синтеза комплекса оба радионуклида ^{212}Pb и ^{212}Bi связаны с лигандом в комплекс. Далее комплексы инкубируются в сыворотке крови. В случае высвобождения ^{212}Bi , образующегося в процессе распада ^{212}Pb , он будет либо связан заново лигандом, либо связан белками сыворотки как свободный катион. Результаты представлены на рисунке 35.

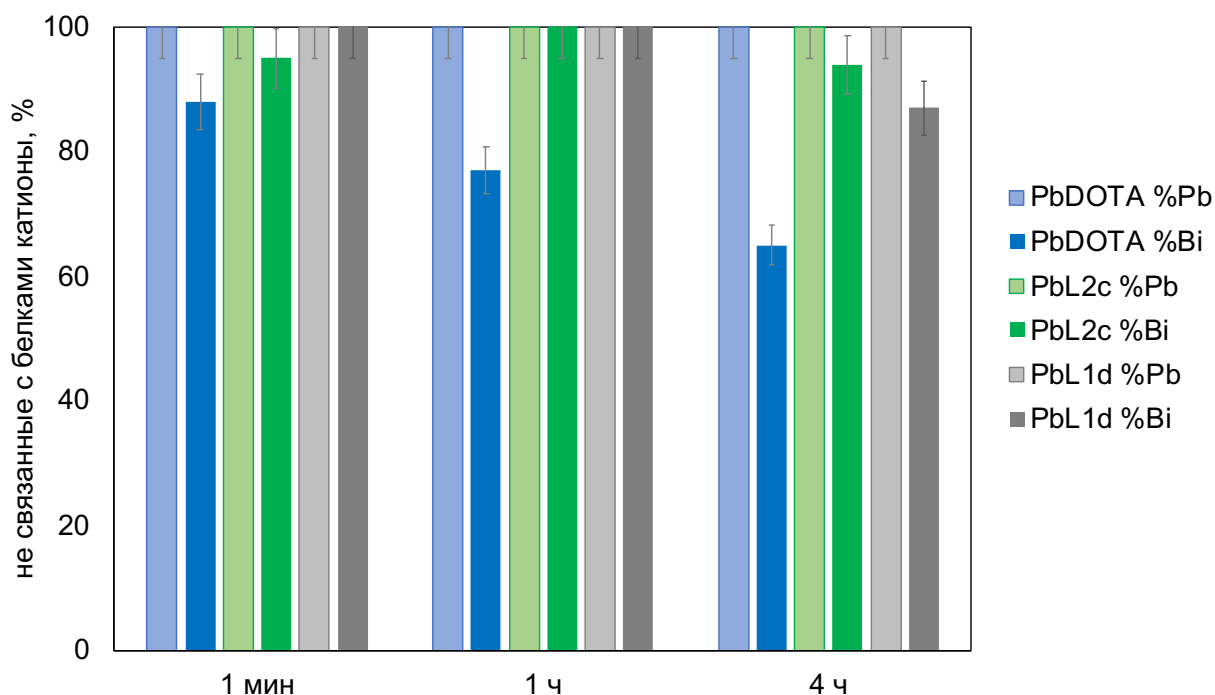


Рис. 35. Устойчивость комплексов $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ с лигандами DOTA, L2c и L1d ($c(\text{L})=0,5 \text{ мМ}$) в среде сывороточных белков.

Как и отмечено в литературе ранее [75], несмотря на устойчивость комплекса PbDOTA, около трети висмута (35%) высвобождается из

комплекса, что в наших экспериментах наблюдается в течение 4 часов. Для тетраацетатного лиганда L2c и трипиколинатного L1d это значение значительно меньше – 6 и 13% соответственно.

В настоящее время в препаратах с ^{212}Pb применяют лишь один хелатор – ТСМС (DOTAM) (рис. 8), однако и для него наблюдается накопление дочернего висмута в нецелевых органах, что говорит о его частичном высвобождении из состава комплекса [125]. Экспериментальных данных о количестве высвобожденного висмута в случае $[^{212}\text{Pb}]\text{PbTCMC}$ литературе нет, математическое моделирование показало, что при замене хелатора с ДОТА на ТСМС высвобождение свинца было снижено вдвое (с 36 до 16%) [77]. Предполагается, что это связано с более высокой скоростью образования комплекса с данным хелатором, и что лиганд пересвязывает высвобождающийся висмут, что можно предположить и в случае исследуемых комплексов.

Снижение связывания висмута с сывороточными белками, а также высокая скорость получения комплексов при комнатной температуре являются преимуществами перед применяемыми в настоящее время в радиофармпрепаратах хелаторами.

3.5.5 Липофильность комплексов меди и свинца

Клиренс радиоактивности из нормальных тканей, таких как печень или почки, зависит не только от кинетической стабильности комплексов, но и от их липофильности. Предполагается, что повышенная липофильность приводит к накоплению в печени, как это наблюдалось для хелаторов на основе азамacroцикла с пиколинатными заместителями [126]. Повышенная липофильность отражается также в более медленном клиренсе комплекса меди с цикламом по сравнению с цикленом [127]. Были определены значения $\lg P$ (коэффициент распределения октанол/вода) для комплексов CuL2d , PbL1d и PbL2c . Для CuL2d $\lg P = -2,9$, для PbL1d – $\lg P = -2,2$, для PbL2c – $\lg P = -3,0$. Сравнительно с литературными данными [126], все лиганды являются

гидрофильными и отдают предпочтение водному слою, что позволяет предположить пониженное накопление в печени.

3.6 Оценка стабильности комплексов *in vivo*

Биораспределение комплексов $[^{64}\text{Cu}]\text{CuL2d}$, $[^{210}\text{Pb}]\text{PbL2c}$ и $[^{210}\text{Pb}]\text{PbL1d}$ было изучено в организме здоровых мышей, а также сравнено с биораспределением свободных катионов (blank-эксперимент). Животным вводился раствор в ацетатном буфере при pH 6,5. Химическая чистота комплекса была охарактеризована с помощью ТСХ и составляла >95%. Сравнилось накопление и выведение радионуклидов из организма. Для оценки накопления были рассчитан процент от введенной дозы для ключевых органов и биологических жидкостей, деленных на массу по формуле (%вв.д./г):

$$\frac{\% \text{ вв. д.}}{\text{г}} = \frac{I_{\text{орг}}}{I_{\text{введ}} \cdot m_{\text{орг}}} \cdot 100$$

где $I_{\text{орг}}$ – измеренная радиоактивность органа, $I_{\text{введ}}$ – радиоактивность введенного образца, а $m_{\text{орг}}$ – масса органа.

3.6.1 Биораспределение комплекса $[^{64}\text{Cu}]\text{CuL2d}$

Через 6 часов после инъекции $[^{64}\text{Cu}]\text{CuL2d}$ радионуклид все еще детектируется в тканях (рис. 36), но, по сравнению со свободными катионами меди (Cu blank), процентное содержание примерно в 1,5 раза ниже для всех органов, в т.ч. печени, кроме мочевого пузыря.

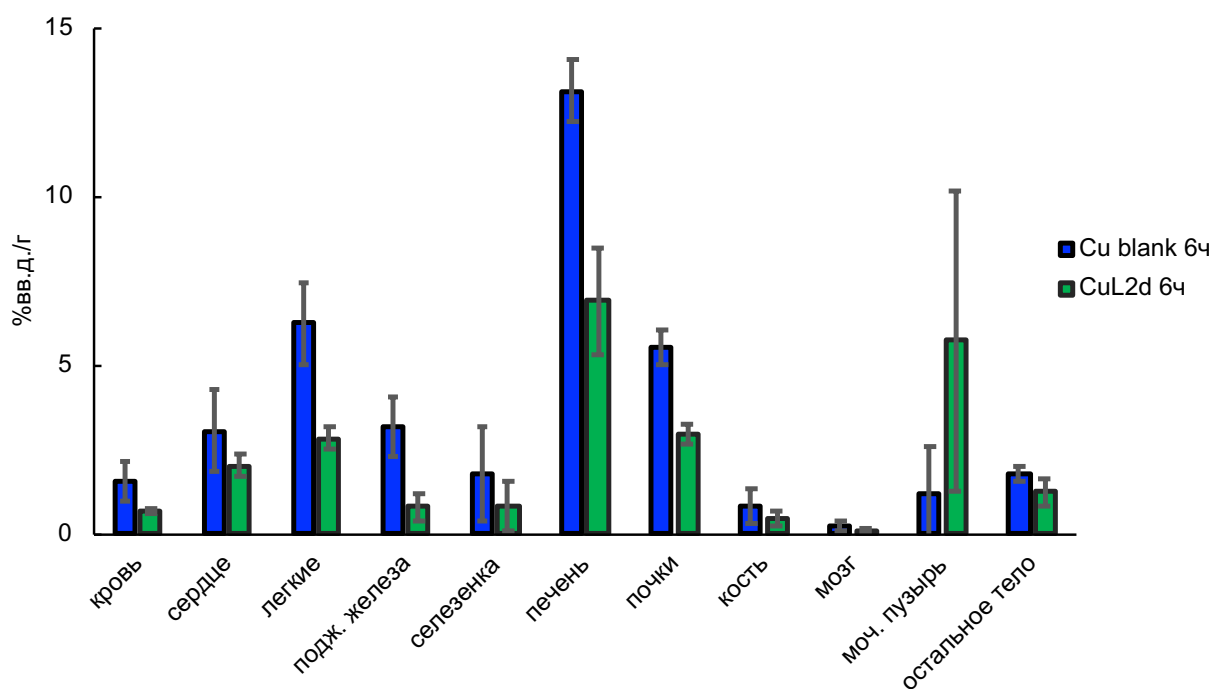


Рис. 36. Биораспределение свободного катиона и комплекса меди с лигандом L2d через 6 часов после инъекции.

Если рассматривать накопление в органах без пересчета на массу (таблица 17), разница в накоплении (по критерию Манна-Уитни) заметна только для крови, легких, поджелудочной железы и мозга, для остальных значений нельзя говорить о разнице в накоплении.

Таблица 17. Распределение радионуклида меди в органах. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение, $n=4$.

	Cu blank, % вв.д.	CuL2d, % вв.д.
кровь	5 \pm 2	2,6 \pm 0,3
сердце	0,6 \pm 0,2	0,4 \pm 0,1
легкие	1,9 \pm 0,2	1 \pm 0,2
подж. железа	0,9 \pm 0,4	0,2 \pm 0,1
селезенка	0,3 \pm 0,3	0,1 \pm 0,1
печень	25 \pm 2	15 \pm 3
почки	3,4 \pm 0,3	2,4 \pm 0,4
кость	0,07 \pm 0,06	0,13 \pm 0,07
мозг	0,05 \pm 0,03	0,14 \pm 0,07
моч. пузырь	0,4 \pm 0,5	3 \pm 2

По профилю выведения (рис. 37) видно, что радионуклид начал значительно выделяться на 5–6 часах после инъекции. Наибольшее

содержание наблюдалось в фекалиях при введении в организм комплекса, в случае Cu blank выведение значительно меньше.

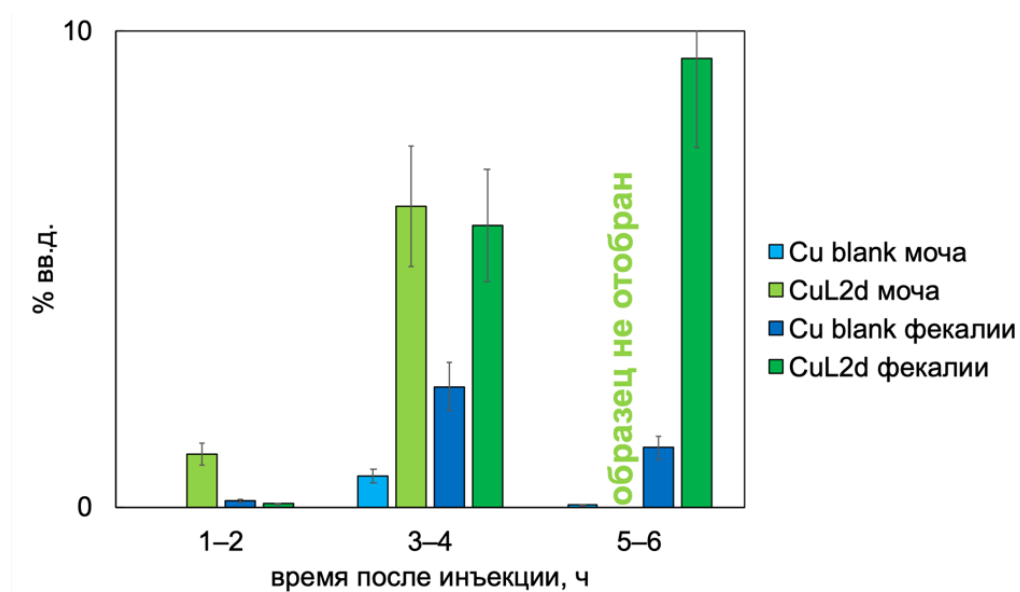


Рисунок 37. Данные метаболической камеры для свободных катионов меди Cu blank комплекса CuL2d.

Образцы мочи из метаболической камеры были проанализированы с помощью ТСХ (рис. 38). В случае внутривенного введения свободных катионов меди через 3-4 часа весь радионуклид остается на старте пластины, что соответствует R_f свободных катионов в данной системе. В случае введения комплекса через 3-4 часа при анализе на ТСХ наблюдаются 2 пятна, соответствующие форме свободных катионов и комплекса CuL2d. Это может говорить о частичной диссоциации комплекса в организме, либо диссоциации уже в моче.

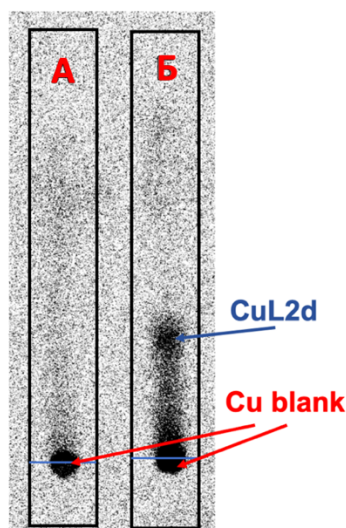


Рисунок 38. ТСХ образцов мочи для группы Cu blank (А) и CuL2d (Б).

Высокая липофильность пиколинатсодержащих лигандов может быть причиной медленного выведения из организма, однако, полученное значение липофильности соответствует гидрофильным лигандам. Другим объяснением высокого накопления через 6 часов может быть медленный метаболизм комплекса в организме. Аналогичные уровни накопления ^{64}Cu в печени в первые часы после инъекции наблюдались для меченых комплексов меди с пиколинатными лигандами и их биоконъюгатами: в случае комплекса меди с НТЕ1РА (HL2, рис. 4), монопиколинат-N-алкилированным лигандом на основе циклама, через 2 часа после введения более 10%вв.д./г оставалось в печени, а через 24 часа комплекс полностью вывелся из организма [32]. При этом комплекс оставался в печени не подвергаясь перехелатированию. Несмотря на длительную кинетику выведения из организма, комплекс был устойчив и может быть использован для конъюгирования с антителами [33]. Более того, даже будучи связанными с биомолекулами, более липофильный характер хелаторов с пиколинатной группой вызывал повышенное накопление в печени: более 10%вв.д./г через 2 часа после введения биоконъюгатов PSMA-направленного пептида с азакраун-пиколинатными лигандами в отличие от конъюгата того же пептида с ацетат-содержащим хелатором [126].

Несмотря на различие в накоплении радионуклида в некоторых органах в случае введения комплекса и свободных катионов меди, присутствие радионуклида в организме через 6 часов после введения может свидетельствовать о частичной диссоциации комплекса.

3.6.2 Биораспределение комплекса $[^{210}\text{Pb}]\text{PbL2d}$

Через 6 часов после инъекции в органах и тканях практически не остается радионуклида (не больше 1,5% вв.д./г) в случае, когда вводился комплекс (таблица 18), в то время как в blank-эксперименте (свободные катионы свинца без добавления лиганда) даже через 6 часов накопление остается высоким (рис. 39). Большое количество радионуклида содержится в моче, в фекалиях содержания радионуклида совсем не наблюдается, что говорит о пути выведения радионуклида из организма. В случае введения в организм комплекса с исследуемым лигандом содержание радионуклида в мочевом пузыре оказалось значительно больше, чем в случае свободного катиона. В фекалиях радионуклид не был обнаружен.

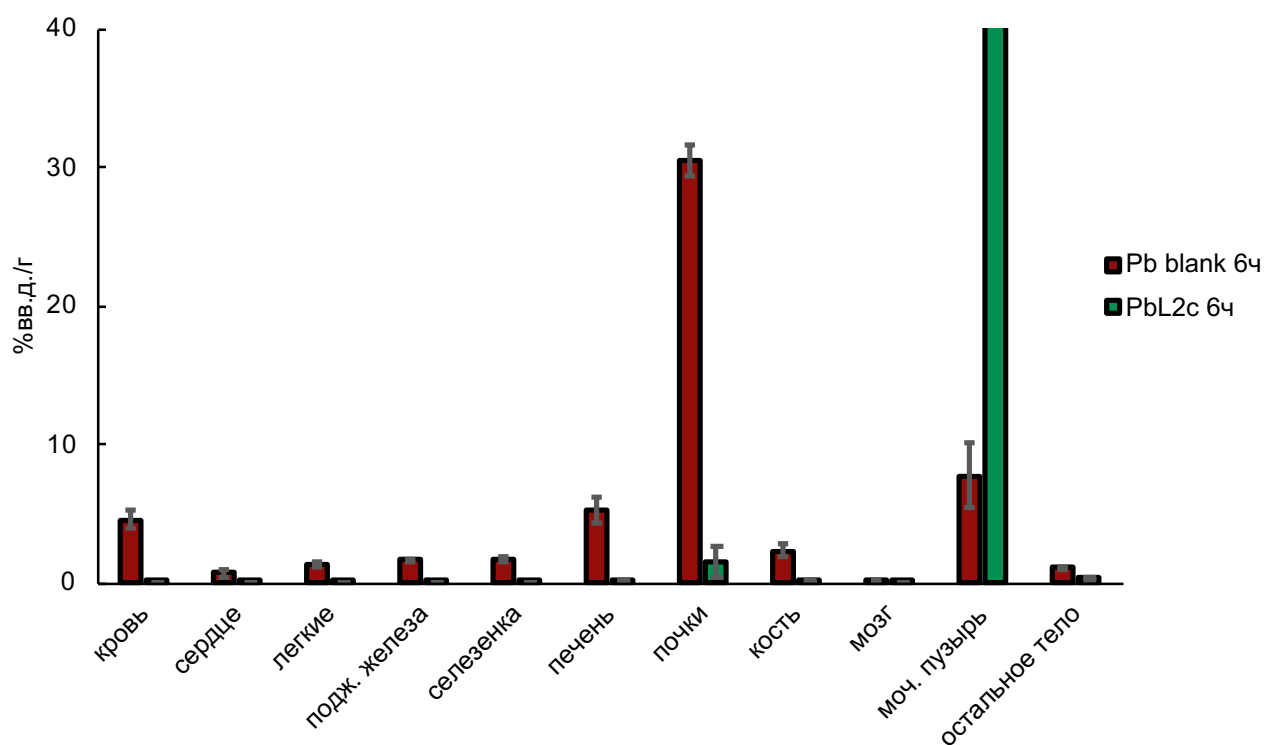


Рис. 39. Биораспределение свободных катионов и комплекса свинца с лигандом L2c через 6 часов после инъекции.

В случае введения в организм свободных катионов свинца заметно его относительно высокое содержание в крови даже через 6 часов – 17% от введенной дозы (таблица 18), что может быть обусловлено характерным для Pb^{2+} связыванием с эритроцитами. Для комплекса практически не наблюдается присутствие в крови. В отличие от данных, полученных с ^{64}Cu , для долгоживущего изотопа свинца ^{210}Pb была возможность провести длительные измерения радиоактивности, поэтому даже в случае малого накопления в органах можно говорить о разнице в накоплении для всех органов.

Таблица 18. Распределение радионуклида свинца в органах. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение, $n=4$.

	Pb blank, % вв.д.	PbL2c, % вв.д.
кровь	17 \pm 2	0,4 \pm 0,1
сердце	0,2 \pm 0,1	0,01 \pm 0,01
легкие	0,9 \pm 0,2	0,02 \pm 0,01
подж. железа	0,43 \pm 0,04	0,02 \pm 0,01
селезенка	0,3 \pm 0,1	0,02 \pm 0,01
печень	16 \pm 2	0,5 \pm 0,1
почки	32 \pm 2	1,5 \pm 0,9
кость	0,5 \pm 0,1	0,03 \pm 0,01
мозг	0,07 \pm 0,03	0,01 \pm 0,01
моч. пузырь	4 \pm 3	40 \pm 21

В связи с инертностью комплекса в организме, а также его быстрым выведением можно сделать вывод, что комплекс $[^{210}Pb]PbL2c$ оказался устойчивым в экспериментах *in vivo*. Данный лиганд, учитывая его быстрое связывание с радионуклидами свинца, устойчивость *in vitro* с $^{212}Pb/^{212}Bi$, инертность к метаболическим процессам комплекса со свинцом и ранее исследованного с висмутом, может стать альтернативой применяемому в настоящее время в радиофармпрепаратах хелатору ТСМС (DOTAM), скорость образования которого ниже.

3.6.3 Биораспределение комплекса $[^{210}Pb]PbL1d$

При введении в организм комплекса с трипиколинатным лигандом L1d через 6 часов радионуклид практически полностью выводится из организма,

небольшое накопление остается в почках и теле, в котором присутствует желудочно-кишечный тракт, не выделенный отдельно (рис. 40).

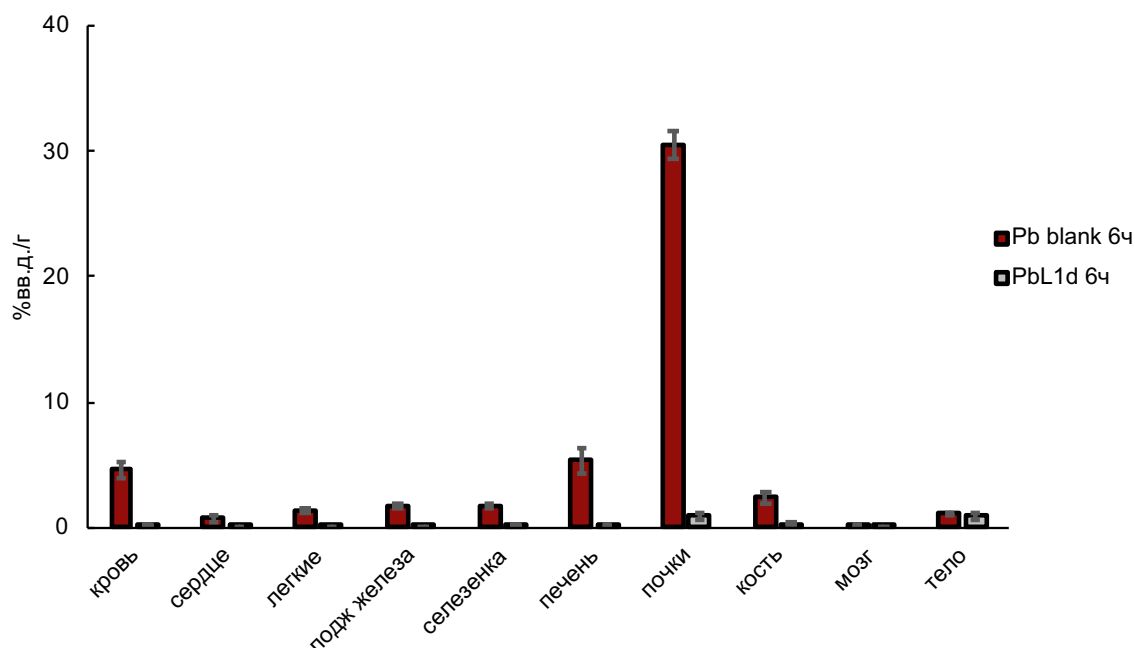


Рис. 40. Биораспределение свободных катионов и комплекса свинца с лигандом L1d через 6 часов после инъекции.

Ни в одном исследуемом органе накопление не превышало 0,5% вв.д. (таблица 19), что показывает еще более быстрое выведение комплекса из организма, чем с тетраацетатным лигандом.

Таблица 19. Распределение радионуклида свинца в органах. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение, n=4.

	Pb blank, % вв.д.	PbL2с, % вв.д.
кровь	17 \pm 2	0,5 \pm 0,2
сердце	0,2 \pm 0,1	0,01 \pm 0,01
легкие	0,9 \pm 0,2	0,04 \pm 0,01
подж. железа	0,43 \pm 0,04	0,02 \pm 0,01
селезенка	0,3 \pm 0,1	0,02 \pm 0,01
печень	16 \pm 2	0,40 \pm 0,05
почки	32 \pm 2	0,39 \pm 0,08
кость	0,5 \pm 0,1	0,03 \pm 0,02
мозг	0,07 \pm 0,03	0,02 \pm 0,01

Анализ образцов, отобранных суммарно за 6 часов в метаболической камере, показал, что комплекс выводится равномерно через мочу и через

фекалии (таблица 20), что закономерно отличает пиколинатный и ацетатный лиганды, так как последний был обнаружен только в мочевом пузыре.

Таблица 20. Суммарное выведение $[^{210}\text{Pb}]\text{PbL1d}$ в образцах из метаболической камеры

	%ВВ.Д.	%ВВ.Д./Г
моча	17 ± 1	35 ± 1
фекалии	21 ± 1	25 ± 1

Комплекс $[^{210}\text{Pb}]\text{PbL1d}$ оказался устойчивым в экспериментах *in vivo* и перспективен для дальнейшего исследования.

Заключение

Азакраун-эфиры с большой полостью (15(18)-краун-5(6)) способны образовывать моно- и биядерные комплексы с катионами меди и свинца. Для катионов свинца наблюдается образование комплексов с высокими константами устойчивости только для лигандов с подвесными группами, без них координирующих атомов недостаточно для Pb^{2+} , для которых характерны КЧ 6–12.

Наличие бóльшего количества донорных атомов азота в структуре лигандов позволяют получать наиболее устойчивые комплексы с радионуклидами меди: комплекс с тетрапиколинатным лигандом L2d оказался устойчивым *in vitro*. Медь в составе данного комплекса устойчива к процессам восстановления при потенциалах, которые могут создаваться *in vivo*. При этом, полученные результаты свидетельствуют о частичной диссоциации комплекса в организме лабораторных мышей.

Все лиганды с подвесными группами также образуют устойчивые *in vitro* комплексы с долгоживущим изотопом ^{210}Pb . Наиболее селективные к катионам свинца лиганды L1d и L2d, для получения комплексов с которыми требовалось наименьшее количество лиганда, были оценены с ^{212}Pb , так как для данного изотопа важно оценить не только устойчивость со свинцом, но и с дочерним радионуклидом висмута. Из состава данных комплексов висмут диссоциирует в значительно меньшей степени – 6 и 13% для L1d и L2c соответственно, чем для известного хелатора DOTA (35%). В настоящее время в радиофармпрепаратах с ^{212}Pb используется другой хелатор – DOTAM (ТСМС), точных данных о диссоциации *in vitro* для него не опубликовано, в работах по математической оценке это значение равно 16%, что сопоставимо с L1d и L2c. В отличие от используемого сейчас хелатора, для получения комплекса с исследуемыми в данной работе не требуется нагрев и выдерживание во времени, что может упростить процесс синтеза препаратов. В условиях живого организма оба комплекса не накапливаются в органах и быстро выводятся, что говорит об их устойчивости.

Выводы

1. Определены значения констант протонирования новых азакраун-эфиров и констант устойчивости их комплексов с катионами меди и свинца. Пиколинатные лиганды в силу большего числа донорных атомов демонстрируют большее число ступеней протонирования, однако ацетатные характеризуются наибольшей основностью.

2. Установлено, что трипиколинатный L1d, тетрапиколинатный L2d и тетраацетатный L2c бензоазакраун-эфиры образуют комплексы с медью с наибольшими константами ($\lg\beta(\text{CuL})$: 19,3, 20,4 и 24,8 соответственно), при этом с ними образуются и комплексы $\text{Cu/L}=2/1$. Для катиона Pb^{2+} наибольшие константы наблюдаются для комплексов с тетрапиколинатным лигандом L2d ($\lg\beta(\text{PbL})$: 21,3) и с тетраацетатным L2c ($\lg\beta(\text{PbL})$: 21,6), только с первым из них наблюдается форма $\text{Pb/L}=2/1$.

3. Комплексы радионуклидов меди и свинца с РХЧ > 90% могут быть получены при комнатной температуре за ≤ 2 минуты, что превосходит по скорости связывания используемые в настоящее время лиганды.

4. Тетрапиколинатный лиганд L2d координирует катионы меди снаружи макроцикла, что позволяет получить инертный *in vitro* комплекс, из которого не происходит высвобождения меди в диапазоне потенциалов, создаваемых восстановителями в организме. Все исследуемые комплексы свинца проявляют устойчивость *in vitro*. В случае ^{212}Pb из комплекса с тетраацетатным лигандом L2c и трипиколинатным L1d высвобождается менее 15% дочернего ^{212}Bi .

5. Профиль биораспределения L2d с Cu^{2+} *in vivo* показывает накопление в печени, что может свидетельствовать о частичном высвобождении катиона. При этом комплексы PbL2c и PbL1d проявляют инертность в условиях живого организма и практически полностью выводятся за 6 часов. Учитывая это и высокую устойчивость комплексов с ^{212}Pb , они представляют интерес для получения радиофармпрепаратов на основе диагностического ^{203}Pb , а также терапевтических $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$.

Список литературы

1. Fraga C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health // *Mol. Aspects Med.* 2005. Vol. 26, № 4-5 SPEC. ISS. P. 235–244.
2. Rubino J.T., Franz K.J. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function // *J. Inorg. Biochem.*, 2012. Vol. 107, № 1. P. 129–143.
3. Kaplan J.H., Maryon E.B. How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal // *Biophys. J. The Authors*, 2016. Vol. 110, № 1. P. 7–13.
4. Inesi G. Molecular features of copper binding proteins involved in copper homeostasis // *IUBMB Life.* 2017. Vol. 69, № 4. P. 211–217.
5. Denoyer D. et al. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer” // *Metallomics.*, 2015. Vol. 7, № 11. P. 1459–1476.
6. Ishida S. et al. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110, № 48. P. 19507–19512.
7. Hilgers K. et al. Cross-section measurements of the nuclear reactions ${}^{nat}\text{Zn}(d,x){}^{64}\text{Cu}$, ${}^{66}\text{Zn}(d,\alpha){}^{64}\text{Cu}$ and ${}^{68}\text{Zn}(p,\alpha n){}^{64}\text{Cu}$ for production of ${}^{64}\text{Cu}$ and technical developments for small-scale production of ${}^{67}\text{Cu}$ via the ${}^{70}\text{Zn}(p,\alpha){}^{67}\text{Cu}$ process // *Appl. Radiat. Isot.* 2003. Vol. 59, № 5–6. P. 343–351.
8. Szűcs Z., Takács S., Alirezapour B. Development of cost effective method for production of ${}^{64}\text{Cu}$ from ${}^{nat}\text{Ni}$ // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2014. Vol. 302, № 2. P. 1035–1038.
9. Abbas K. et al. Cyclotron production of ${}^{64}\text{Cu}$ by deuteron irradiation of ${}^{64}\text{Zn}$ // *Appl. Radiat. Isot.* 2006. Vol. 64, № 9. P. 1001–1005.
10. Ohya T. et al. Efficient preparation of high-quality ${}^{64}\text{Cu}$ for routine use // *Nucl. Med. Biol.* 2016. Vol. 43, № 11. P. 685–691.
11. Xie Q. et al. Establishing reliable ${}^{64}\text{Cu}$ production process: From target plating to molecular specific tumor micro-PET imaging // *Molecules.* 2017.

Vol. 22, № 4.

12. McCarthy D.W. et al. Efficient production of high specific activity ^{64}Cu using a biomedical cyclotron // Nucl. Med. Biol. 1997. Vol. 24, № 1. P. 35–43.
13. Rowshanfarzad P. et al. An overview of copper radionuclides and production of ^{61}Cu by proton irradiation of natZn at a medical cyclotron // Appl. Radiat. Isot. 2006. Vol. 64, № 12. P. 1563–1573.
14. Smith N.A., Bowers D.L., Ehst D.A. The production, separation, and use of ^{67}Cu for radioimmunotherapy: A review // Appl. Radiat. Isot. Elsevier, 2012. Vol. 70, № 10. P. 2377–2383.
15. Szelecsényi F. et al. Investigation of the $^{68}\text{Zn}(p, 2p)^{67}\text{Cu}$ nuclear reaction: New measurements up to 40 MeV and compilation up to 100 MeV // Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms., 2009. Vol. 267, № 11. P. 1877–1881.
16. Stoll T. et al. Excitation functions of proton induced reactions on ^{68}Zn from threshold up to 71 MeV, with specific reference to the production of ^{67}Cu // Radiochim. Acta. 2002. Vol. 90, № 6. P. 309–313.
17. Mikolajczak R., Ji P. Reactor Produced Beta-emitting Nuclides for Nuclear Medicine // World J. Nucl. Med. 2005. Vol. 36, № 44. P. 184–190.
18. Howard S., Starovoitova V.N. Target optimization for the photonuclear production of radioisotopes // Appl. Radiat. Isot., 2015. Vol. 96. P. 162–167.
19. Bormans G. et al. A $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ generator for the routine production of ^{62}Cu -PTSM // Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot. 1992. Vol. 43, № 12. P. 1437–1441.
20. Fukumura T. et al. An improved $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ generator based on a cation exchanger and its fully remote-controlled preparation for clinical use // Nucl. Med. Biol. 2006. Vol. 33, № 6. P. 821–827.
21. Williams H.A. et al. A comparison of PET imaging characteristics of various copper radioisotopes // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2005. Vol. 32, № 12. P. 1473–1480.
22. McCarthy D.W. et al. High purity production and potential applications of

- copper-60 and copper-61 // Nucl. Med. Biol. 1999. Vol. 26, № 4. P. 351–358.
23. Shannon R.D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides // Acta Crystallogr. Sect. A. 1976. Vol. 32, № 5. P. 751–767.
 24. Rulisek L., Vondrasek L. Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺ , Ni²⁺ , // J. Inorg. Biochem. 1998. Vol. 71. P. 155–127.
 25. Blower P.J., Lewis J.S., Zweit J. Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine // Nucl. Med. Biol. 1996. Vol. 23, № 8. P. 957–980.
 26. Wei L. et al. ⁶⁴Cu-Labeled CB-TE2A and diamsar-conjugated RGD peptide analogs for targeting angiogenesis: comparison of their biological activity // Nucl. Med. Biol. 2009. Vol. 36, № 3. P. 277–285.
 27. Alirezapour B. et al. Development of [⁶⁴Cu]-DOTA-PR81 radioimmunoconjugate for MUC-1 positive PET imaging // Nucl. Med. Biol. 2016. Vol. 43, № 1. P. 73–80.
 28. Fournier P. et al. Comparative study of ⁶⁴Cu/NOTA-[D-Tyr⁶,βAla¹¹,Thi¹³,Nle¹⁴]BBN(6-14) monomer and dimers for prostate cancer PET imaging // EJNMMI Res. 2012. Vol. 2, № 1. P. 8.
 29. Liu S. et al. The Efficient Synthesis and Biological Evaluation of Novel Bi-Functionalized Sarcophagine for ⁶⁴Cu Radiopharmaceuticals // Theranostics. Ivyspring International Publisher, 2012. Vol. 2. P. 589–596.
 30. Guillou A. et al. 1,4,7-Triazacyclononane-Based Bifunctional Picolinate Ligands for Efficient Copper Complexation // Eur. J. Inorg. Chem. 2017. Vol. 2017, № 18. P. 2435–2443.
 31. Lima L.M.P. et al. Monopicolinate Cyclen and Cyclam Derivatives for Stable Copper(II) Complexation // Inorg. Chem., 2012. Vol. 51, № 12. P. 6916–6927.
 32. Frindel M. et al. Radiolabeling of HTE1PA: A new monopicolinate cyclam derivative for Cu-64 phenotypic imaging. In vitro and in vivo stability studies in mice // Nucl. Med. Biol. 2014. Vol. 41. P. e49–e57.
 33. Frindel M. et al. Cyclam telpa for ⁶⁴Cu PET imaging. Bioconjugation to

- antibody, radiolabeling and preclinical application in xenografted colorectal cancer // RSC Adv. Vol. 7, № 15. P. 9272–9283.
34. Price E.W., Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals // Chem. Soc. Rev., 2014. Vol. 43, № 1. P. 260–290.
 35. Qin C. et al. Theranostics of Malignant Melanoma with $^{64}\text{CuCl}_2$ // J. Nucl. Med. 2014. Vol. 55, № 5. P. 812–817.
 36. Safi R. et al. Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics // Cancer Res. 2014. Vol. 74, № 20. P. 5819–5831.
 37. Chakravarty R., Chakraborty S., Dash A. $^{64}\text{Cu}^{2+}$ Ions as PET Probe: An Emerging Paradigm in Molecular Imaging of Cancer // Mol. Pharm. 2016. Vol. 13, № 11. P. 3601–3612.
 38. Catalogna G. et al. The SGK1 Kinase Inhibitor SII13 Sensitizes Theranostic Effects of the $^{64}\text{CuCl}_2$ in Human Glioblastoma Multiforme Cells // Cell. Physiol. Biochem. 2017. Vol. 43, № 1. P. 108–119.
 39. Panichelli P. et al. Imaging of Brain Tumors with Copper-64 Chloride: Early Experience and Results // Cancer Biother. Radiopharm. 2016. Vol. 31, № 5. P. 159–167.
 40. Boschi A. et al. The emerging role of copper-64 radiopharmaceuticals as cancer theranostics // Drug Discov. Today., 2018. Vol. 23, № 8. P. 1489–1501.
 41. Sundin A. et al. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Radiological, Nuclear Medicine and Hybrid Imaging // Neuroendocrinology. 2017. Vol. 105, № 3. P. 212–244.
 42. Ambrosini V. et al. Consensus on molecular imaging and theranostics in neuroendocrine neoplasms // Eur. J. Cancer., 2021. Vol. 146. P. 56–73.
 43. Morgenstern A. et al. An Overview of Targeted Alpha Therapy with ^{225}Ac and ^{213}Bi // Current Radiopharmaceuticals, 2018, V. 11, I. 3, P. 200 - 208.
 44. База данных о клинических исследованиях препаратов clinicaltrials.gov
URL: <http://clinicaltrials.gov/> [Electronic resource].
 45. Pfeifer A. et al. Clinical PET of Neuroendocrine Tumors Using ^{64}Cu -

- DOTATATE: First-in-Humans Study // J. Nucl. Med. 2012. Vol. 53, № 8. P. 1207–1215.
46. Pfeifer A. et al. ^{64}Cu -DOTATATE PET for Neuroendocrine Tumors: A Prospective Head-to-Head Comparison with ^{111}In -DTPA-Octreotide in 112 Patients // J. Nucl. Med. 2015. Vol. 56, № 6. P. 847 LP – 854.
47. Johnbeck C.B. et al. Head-to-Head Comparison of ^{64}Cu -DOTATATE and ^{68}Ga -DOTATOC PET/CT: A prospective study of 59 patients with neuroendocrine tumors // J. Nucl. Med. 2017. Vol. 58, № 3. P. 451–457.
48. Hartmann K.; Freudenberg, R.; Oehme, L.; Andreeff, M.; Wunderlich, G.; Eisenhofer, G.; Kotzerke, J. H.. Z. Radiation exposure of patients during ^{68}Ga -DOTATOC PET/CT examinations TT - Strahlenexposition der Patienten bei Untersuchungen mit ^{68}Ga -DOTATOC am PET/CT // Nuklearmedizin. Schattauer GmbH, 2009. Vol. 48, № 05. P. 201–207.
49. Kwekkeboom D.J. et al. Comparison of ^{111}In -DOTA-Tyr3-octreotide and ^{111}In -DTPA-octreotide in the same patients: biodistribution, kinetics, organ and tumor uptake // J. Nucl. Med. Soc Nuclear Med, 1999. Vol. 40, № 5. P. 762–767.
50. Hicks R.J. et al. (^{64}Cu)-SARTATE PET Imaging of Patients with Neuroendocrine Tumors Demonstrates High Tumor Uptake and Retention, Potentially Allowing Prospective Dosimetry for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. // J. Nucl. Med. United States, 2019. Vol. 60, № 6. P. 777–785.
51. Cullinane C. et al. Comparing the therapeutic efficacy of ^{67}Cu -SARTATE and ^{177}Lu -DOTA-octreotate in a neuroendocrine tumor model // J. Nucl. Med. 2018. Vol. 59, № supplement 1. P. 315 LP – 315.
52. Cantiello F. et al. 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. Elsevier Inc., 2017. Vol. 106. P. 139–145.

53. Grubmüller B. et al. ⁶⁴ Cu-PSMA-617 PET/CT Imaging of Prostate Adenocarcinoma: First In-Human Studies // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2016. Vol. 31, № 8. P. 277–286.
54. Persson M. et al. First-in-human uPAR PET: Imaging of cancer aggressiveness // *Theranostics.* 2015. Vol. 5, № 12. P. 1303–1316.
55. Persson M. et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor as a potential PET biomarker in glioblastoma // *J. Nucl. Med. Soc Nuclear Med,* 2016. Vol. 57, № 2. P. 272–278.
56. Philpott G.W. et al. RadioimmunoPET: detection of colorectal carcinoma with positron-emitting copper-64-labeled monoclonal antibody // *J. Nucl. Med. Soc Nuclear Med,* 1995. Vol. 36, № 10. P. 1818–1824.
57. Tripathi S. et al. VPAC1 Targeted ⁶⁴Cu-TP3805 Positron Emission Tomography Imaging of Prostate Cancer: Preliminary Evaluation in Man // *Urology.* 2016. Vol. 88. P. 111–118.
58. Bergeson L.L. The proposed lead NAAQS: Is consideration of cost in the clean air act's future? // *Environ. Qual. Manag.* 2008. Vol. 18, № 1. P. 79–84.
59. Horak E. et al. Radioimmunotherapy targeting of HER2/neu oncoprotein on ovarian tumor using lead-212-DOTA-AE1 // *J. Nucl. Med. Soc Nuclear Med,* 1997. Vol. 38, № 12. P. 1944–1950.
60. Wang M.-W. Combined Chitosan Nano-Bead with Microfluidic-Microelectric Traps of Lead (II) Chelation in Continuous Bloodstream Flow // *ECS Trans.* 2010. Vol. 28, № 33. P. 7–19.
61. Wani A.L., Ara A., Usmani J.A. Lead toxicity: a review // *Interdiscip Toxicol.* 2015. Vol. 8, № 2. P. 55–64.
62. Carbo-Bague I., Ramogida C.F. Emerging Therapeutic Radiopharmaceuticals and Their Theranostic Pairs // *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry.* John Wiley & Sons, Ltd, 2021. P. 1–34.
63. Horlock P.L., Thakur M.L., Watson I.A. Cyclotron produced lead-203 // *Postgrad. Med. J.* 1975. Vol. 51, № 601. P. 751–754.
64. Li M. et al. Automated cassette-based production of high specific activity

- [203/212Pb]peptide-based theranostic radiopharmaceuticals for image-guided radionuclide therapy for cancer // *Appl. Radiat. Isot.* 2017. Vol. 127. P. 52–60.
65. Garmestani K. et al. Purification of cyclotron-produced 203Pb for labeling Herceptin // *Nucl. Med. Biol.* 2005. Vol. 32, № 3. P. 301–305.
 66. Máthé D. et al. Production and in vivo imaging of 203Pb as a surrogate isotope for in vivo 212Pb internal absorbed dose studies // *Appl. Radiat. Isot.* 2016. Vol. 114. P. 1–6.
 67. Hassfjell S.P., Hoff P. A generator for production of 212Pb and 212Bi // *Appl. Radiat. Isot.* 1994. Vol. 45, № 10. P. 1021–1025.
 68. Hassfjell S. A 212Pb generator based on a 228Th source // *Appl. Radiat. Isot.* 2001. Vol. 55, № 4. P. 433–439.
 69. Bartoś B. et al. Search of ligands suitable for 212Pb/212Bi in vivo generators // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2013. Vol. 295, № 1. P. 205–209.
 70. Westrøm S. et al. Preparation of 212Pb-labeled monoclonal antibody using a novel 224Ra-based generator solution // *Nucl. Med. Biol.* 2017. Vol. 51. P. 1–9.
 71. Atcher R.W., Friedman A.M., Hines J.J. An improved generator for the production of 212Pb and 212Bi from 224Ra // *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part A. Appl. Radiat. Isot.* 1988. Vol. 39, № 4. P. 283–286.
 72. Zucchini G.L., Friedman A.M. Isotopic generator for 212Pb and 212Bi // *International Journal of Nuclear Medicine and Biology*, V. 9, I. 1, 1982, P. 83–84 .
 73. Baidoo K.E., Milenic D.E., Brechbiel M.W. Methodology for labeling proteins and peptides with lead-212 (212Pb) // *Nucl. Med. Biol.* 2013. Vol. 40, № 5. P. 592–599.
 74. Su F.-M. et al. Pretargeted radioimmunotherapy in tumored mice using an in vivo 212Pb/212Bi generator // *Nucl. Med. Biol.* 2005. Vol. 32, № 7. P. 741–747.
 75. Mirzadeh S., Kumar K., Gansow O.A. The chemical fate of 212Bi-DOTA formed by β - decay of 212Pb(DOTA)2- // *Radiochim. Acta. Germany*, 1993.

Vol. 60, № 1. P. 1–10.

76. Stenberg V.Y., Juzeniene A., Larsen R.H. In situ Generated ^{212}Pb -PSMA Ligand in a ^{224}Ra -Solution for Dual Targeting of Prostate Cancer Sclerotic Stroma and PSMA-Positive Cells // *Curr. Radiopharm.* 2020. Vol. 13. P. 130–141.
77. Zaid N. et al. Evaluating bifunctional chelation for ^{212}Pb using a mathematical model // *J. Nucl. Med.* 2020. Vol. 61, № supplement 1. P. 1109 LP – 1109.
78. Ingham A. et al. H2ampa—Versatile Chelator for ^{203}Pb][Pb^{2+} , ^{213}Bi][Bi^{3+} , and ^{225}Ac][Ac^{3+} // *Inorg. Chem.*, 2022. Vol. 61, № 24. P. 9119–9137.
79. Agus D.B. et al. HER-2/neu as a therapeutic target in non-small cell lung cancer, prostate cancer, and ovarian cancer // *Semin. Oncol.* 2000. Vol. 27, № 6 Suppl 11. P. 53—63; discussion 92—100.
80. Ross J.S., j. McKenna B. The HER-2/neu Oncogene in Tumors of the Gastrointestinal Tract // *Cancer Invest.* Taylor & Francis, 2001. Vol. 19, № 5. P. 554–568.
81. Milenic D.E. et al. Potentiation of High-LET Radiation by Gemcitabine: Targeting HER2 with Trastuzumab to Treat Disseminated Peritoneal Disease // *Clin. Cancer Res.* 2007. Vol. 13, № 6. P. 1926–1935.
82. Milenic D.E. et al. Multimodality Therapy: Potentiation of High Linear Energy Transfer Radiation with Paclitaxel for the Treatment of Disseminated Peritoneal Disease // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14, № 16. P. 5108–5115.
83. Milenic D.E. et al. Improved efficacy of α -particle-targeted radiation therapy // *Cancer.* 2010. Vol. 116, № S4. P. 1059–1066.
84. Meredith R.F. et al. Pharmacokinetics and Imaging of ^{212}Pb -TCMC-Trastuzumab After Intraperitoneal Administration in Ovarian Cancer Patients // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2013. Vol. 29, № 1. P. 12–17.
85. Meredith R. et al. Dose Escalation and Dosimetry of First-in-Human α Radioimmunotherapy with ^{212}Pb -TCMC-Trastuzumab // *J. Nucl. Med.* 2014. Vol. 55, № 10. P. 1636 LP – 1642.

86. Delpassand E.S. et al. Targeted α -Emitter Therapy with ^{212}Pb -DOTAMTATE for the Treatment of Metastatic SSTR-Expressing Neuroendocrine Tumors: First-in-Humans Dose-Escalation Clinical Trial // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine*, 2022. Vol. 63, № 9. P. 1326–1333.
87. Li M. et al. Preclinical Evaluation of a Lead Specific Chelator (PSC) Conjugated to Radiopeptides for ^{203}Pb and ^{212}Pb -Based Theranostics // *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2.
88. Müller D. et al. ^{203}Pb -VMT- α -NET Scintigraphy of a Patient With Neuroendocrine Tumor // *Clin. Nucl. Med.* 2023. Vol. 48, № 1.
89. Damu K. V et al. Control of metal ion selectivity in ligands containing neutral oxygen and pyridyl groups // *Inorg. Chem.*, 1986. Vol. 25, № 22. P. 3879–3883.
90. Bordunov A. V et al. Synthesis and Properties of 5-Chloro-8-hydroxyquinoline-Substituted Azacrown Ethers: A New Family of Highly Metal Ion-Selective Lariat Ethers // *Inorg. Chem.*, 1996. Vol. 35, № 25. P. 7229–7240.
91. Gomaa E.A., Al-Jahdalli B.M. Conductometric studies of ionic association of divalent asymmetric electrolyte $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ with Kryptofix-22 in mixed (MeOH-DMF) solvents at different temperatures // *Am. J. Condens. matter Phys. Citeseer*, 2012. Vol. 2, № 1. P. 16–21.
92. Liu S. Ether and crown ether-containing cationic $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complexes useful as radiopharmaceuticals for heart imaging // *Dalt. Trans.*, 2007. № 12. P. 1183–1193.
93. Abou D.S. et al. Towards the stable chelation of radium for biomedical applications with an 18-membered macrocyclic ligand // *Chem. Sci.*, 2021. Vol. 12, № 10. P. 3733–3742.
94. Thiele N.A. et al. An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2017. Vol. 56, № 46. P. 14712–14717.
95. Yang H. et al. A novel actinium bifunctional chelator Crown and

- biodistribution of Ac-225-Crown-TATE // Journal of Nuclear Medicine, 2020, V. 61, I. supplement 1, LP. 1235.
96. Deal K.A. et al. Improved in vivo stability of actinium-225 macrocyclic complexes // J. Med. Chem. ACS Publications, 1999. Vol. 42, № 15. P. 2988–2992.
 97. Yang H. et al. Harnessing α -emitting radionuclides for therapy: radiolabeling method review // J. Nucl. Med. Soc Nuclear Med, 2022. Vol. 63, № 1. P. 5–13.
 98. Fiszbein D.J. et al. Tuning the Kinetic Inertness of Bi³⁺ Complexes: The Impact of Donor Atoms on Diaza-18-Crown-6 Ligands as Chelators for ²¹³Bi Targeted Alpha Therapy // Inorg. Chem., 2021. Vol. 60, № 12. P. 9199–9211.
 99. Thiele N.A., Woods J.J., Wilson J.J. Implementing f-Block Metal Ions in Medicine: Tuning the Size Selectivity of Expanded Macrocycles // Inorg. Chem., 2019. Vol. 58, № 16. P. 10483–10500.
 100. Gans P., Sabatini A., Vacca A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs // Talanta. 1996. Vol. 43, № 10. P. 1739–1753.
 101. Aliev R.A. et al. Photonuclear production and radiochemical separation of medically relevant radionuclides: ⁶⁷Cu // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2019. Vol. 321, № 1. P. 125–132.
 102. Lead-210 and Polonium-210 in water / Eichrom [Electronic resource]. URL: https://www.eichrom.com/wp-content/uploads/2018/02/pbw01-21_pb-po-water-vbs.pdf.
 103. Федотова А.О. Комплексы Sc³⁺, Y³⁺, Tb³⁺(Eu³⁺) и Bi³⁺ с конъюгатами коротких аналогов соматостатина для диагностики и терапии онкологических заболеваний // дис. канд. хим. наук.- М., 2023.- Режим доступа: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2678>
 104. Gasser G. et al. Synthesis, Copper(II) Complexation, ⁶⁴Cu-Labeling, and Bioconjugation of a New Bis(2-pyridylmethyl) Derivative of 1,4,7-Triazacyclononane // Bioconjug. Chem. American Chemical Society, 2008.

- Vol. 19, № 3. P. 719–730.
105. Whitten J.L. Coulombic potential energy integrals and approximations // *J. Chem. Phys.* 1973. Vol. 58, № 10. P. 4496–4501.
 106. Weigend F., Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005. Vol. 7, № 18. P. 3297.
 107. Neese F. et al. The ORCA quantum chemistry program package // *J. Chem. Phys.* 2020. Vol. 152, № 22. P. 224108.
 108. Chernyshov A.A., Veligzhanin A., Zubavichus Y. Structural Materials Science End-Station at the Kurchatov Synchrotron Radiation Source: Recent Instrumentation Upgrades and Experimental Results // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* 2009. Vol. 603. P. 95–98.
 109. Newville M. IFEFFIT: interactive XAFS analysis and FEFF fitting // *J. Synchrotron Radiat.* 2001. Vol. 8, № 2. P. 322–324.
 110. Алешин Глеб. Комплексы Cu^{2+} , Zn^{2+} и Bi^{3+} с азакраун-эффирами как потенциальные компоненты радиофармпрепаратов. // дис. канд. хим. наук.- М., 2020.- Режим доступа: [Electronic resource]: <https://istina.msu.ru/dissertations/258218321/>.
 111. Aleshin G.Y. et al. Zinc and copper complexes with azacrown ethers and their comparative stability in vitro and in vivo // *Dalt. Trans.*, 2020. Vol. 49, № 19. P. 6249–6258.
 112. Matazova E. V et al. Benzoazacrown compound: a highly effective chelator for therapeutic bismuth radioisotopes // *Med. Chem. Commun.*, 2019. Vol. 10, № 9. P. 1641–1645.
 113. Martell A.E., Smith R.M. Critical stability constants. Springer, 1974. Vol. 1.
 114. Roca-Sabio A. et al. Macrocyclic Receptor Exhibiting Unprecedented Selectivity for Light Lanthanides // *J. Am. Chem. Soc.*, 2009. Vol. 131, № 9. P. 3331–3341.
 115. Roger M. et al. Monopicolinate-dipicolyl derivative of triazacyclononane for

- stable complexation of Cu^{2+} and $^{64}\text{Cu}^{2+}$ // *Inorg. Chem.* 2013. Vol. 52, № 9. P. 5246–5259.
116. Fedorov Y. V et al. 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.
117. Zubenko A.D. et al. Out-cage metal ion coordination by novel benzoazacrown bisamides with carboxyl, pyridyl and picolinate pendant arms // *Tetrahedron*. 2019. Vol. 75, № 19. P. 2848–2859.
118. Macek K. Handbook of thin-layer chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2002. Vol. 588, № 1–2. P. 365–366.
119. Clarke E.T., Martell A.E. Stabilities of the alkaline earth and divalent transition metal complexes of the tetraazamacrocyclic tetraacetic acid ligands // *Inorganica Chim. Acta*. 1991. Vol. 190, № 1. P. 27–36.
120. Konecny R. et al. CuZn Superoxide Dismutase Geometry Optimization, Energetics, and Redox Potential Calculations by Density Functional and Electrostatic Methods // *Inorg. Chem.*, 1999. Vol. 38, № 5. P. 940–950.
121. Egorova B. V et al. Comparative Study of Macrocyclic and Acyclic Picolinate Derivatives for Chelation of Copper Cations // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2021. Vol. 2021, № 45. P. 4700–4709.
122. Wadas T.J. et al. Coordinating Radiometals of Copper , Gallium , Indium , Yttrium , and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. 2010. P. 2858–2902.
123. Bai J. et al. Interaction mechanism of $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ on bovine serum albumin: Vitro simulation experiments by spectroscopic methods // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2023. Vol. 293. P. 122491.
124. Guo M. et al. Binding between lead ions and the high-abundance serum proteins // *Chemosphere*. 2014. Vol. 112. P. 472–480.
125. Stenberg V. et al. Targeting of metastatic prostate cancer with alpha particle generating ^{212}Pb -labeled PSMA seeking ligands // *J. Nucl. Med.* 2020. Vol. 61, № supplement 1. P. 65 LP – 65.

126. Vaughn B.A. et al. Is Less More? Influence of the Coordination Geometry of Copper(II) Picolinate Chelate Complexes on Metabolic Stability // *Inorg. Chem.*, 2020. Vol. 59, № 22. P. 16095–16108.
127. Jones-Wilson T.M. et al. The in vivo behavior of copper-64-labeled azamacrocyclic complexes // *Nucl. Med. Biol.* 1998. Vol. 25, № 6. P. 523–530.