

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Химический факультет

На правах рукописи



Матазова Екатерина Викторовна
**Комплексы Vi^{3+} и As^{3+} с бензоазакраун-эфиром как компоненты
терапевтических радиофармпрепаратов**

1.4.13 – Радиохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н., с.н.с. Егорова Б.В.

Москва - 2023

Оглавление

Термины и сокращения.....	3
Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	10
1.1 РФЛП терапевтического назначения.....	10
1.2 Лиганды, используемые в составе РФЛП.....	17
1.3 Физикохимические особенности процесса комплексообразования.....	24
2. Экспериментальная часть.....	31
2.1 Оборудование и материалы.....	31
2.2 Определение констант протонирования лиганда и устойчивости комплексов.....	33
2.3 Определение структуры комплексов.....	37
2.4 Определение радиохимической чистоты комплексов Vi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA	38
2.5 Спектроскопия в УФ-диапазоне.....	38
2.6 Стабильность <i>in vitro</i>	39
2.7 Биораспределение в организме мышей.....	40
3. Результаты и обсуждение.....	42
3.1 Определение констант протонирования лиганда.....	42
3.2 Исследование термодинамической устойчивости комплексов Vi^{3+} , La^{3+} и Ac^{3+} с лигандами H_4DOTA и H_4BATA	44
3.3 Исследование структуры комплексов Vi^{3+} , La^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA	58
3.4 Синтез и определение радиохимической чистоты комплексов Vi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA	64
3.5 Сравнение скорости образования и диссоциации комплекса Vi^{3+} с H_4BATA с типовыми комплексами. Определение механизма протон-ассоциированной диссоциации.....	71
3.6 Определение кинетической стабильности комплексов H_4BATA с Vi^{3+} и Ac^{3+} в среде конкурентных катионов и в сыворотке крови.....	79
3.7 Исследование биораспределения комплексов Vi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA в организме здоровых мышей.....	84
Выводы.....	89
Список литературы.....	90
Приложение.....	103
Благодарности.....	110

Термины и сокращения

РФЛП – радиофармацевтический лекарственный препарат (лекарственный препарат, который в готовой для использования форме содержит один или несколько радионуклидов)

ИИ – ионизирующее излучение

ЛПЭ – линейная передача энергии (средняя энергия, поглощаемая средой в месте прохождения заряженной частицы, отнесенная к единице ее пути)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Аффибоди – таргетные молекулы, имеют меньшие размеры по сравнению с антителом, но большие, по сравнению с пептидами

EGFR (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста

FDA (Food and Drug Administration) – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США, занимается сертификацией товаров и технологий, имеющих отношение к здоровью человека, в том числе новых лекарств

PSMA (Prostate specific membrane antigen) – простатспецифический мембранный антиген, одна из биологических мишеней для доставки лекарств против рака предстательной железы и диагностики

ТАТ – таргетная альфа-терапия

FISRE (free-ion selective radiotracer extraction) – метод экстракции свободного иона с использованием радиоактивной метки

ЯМР спектроскопия (спектроскопия ядерного магнитного резонанса) – метод исследования химических объектов, использующий явление ядерного магнитного резонанса

ИСП-МС – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

ТСХ – тонкослойная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Изотонические растворы – водные растворы, осмотическое давление которых равно осмотическому давлению плазмы крови

РХЧ – радиохимическая чистота; определяется как доля радионуклида, находящегося (например, в РФЛП) в необходимой химической форме

Н₄ДОТА – 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота

Н₅ДТРА – 2,2',2'',2'''- {[карбоксиметил]азандиил}бис(этан-2,1-диилнитрило)} тетрауксусная кислота

Н₄ВАТА – 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-тетрадекагидро-1,16,4,7,10,13-бензодиоксатетраазациклооктадецин-4,7,10,13-ил-тетрауксусная кислота

Период полупревращения – время, которое необходимо для превращения половины исходного количества вещества

Введение

Актуальность исследования

Лечение рака может включать различные стратегии, например, хирургию, химиотерапию, а также методы ядерной медицины, в основе которых лежит воздействие ионизирующего излучения (ИИ). Сегодня широко применяют внешнюю лучевую терапию, при которой опухоль и некоторая область вокруг нее подвергаются воздействию рентгеновского излучения. При таком подходе облучению подвергаются и здоровые ткани. Поэтому разрабатываются новые методы, которые позволяют снизить дозовую нагрузку на здоровые клетки. При радионуклидной терапии источник ИИ вводят непосредственно в организм, излучение радионуклидов направлено точно на больные клетки, что уменьшает потенциальные побочные эффекты. Наиболее известный пример радионуклидной терапии – это терапия с использованием ^{131}I в форме йодида калия, который накапливается преимущественно в щитовидной железе, что можно использовать при патологиях щитовидной железы. Однако подобное селективное накопление радионуклидов в простой химической форме – редкое явление, и для терапии различных видов опухолей нужны другие молекулы, которые могли бы селективно доставить ИИ к клетке-мишени. В пептид-рецепторной таргетной терапии в качестве такой таргетной молекулы используется биомолекула, которая обладает сродством к рецепторам на поверхности определённых раковых клеток, за счёт чего радионуклид селективно накапливается именно в этих клетках, не затрагивая здоровые. На данный момент два препарата на основе β^- -излучателя [^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE для лечения нейроэндокринных опухолей и [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 для лечения метастазирующего рака простаты недавно были одобрены и уже успешно применяются в медицинской практике [1]. Однако α -излучающие радионуклиды все чаще рассматриваются в качестве новых и более эффективных радиофармпрепаратов для терапии метастаз и небольших опухолей, по сравнению с β^- -излучателями. Это обусловлено значительно более высокими значениями линейной передачи энергии (ЛПЭ) α -частиц, в результате чего они более цитотоксичны, чем β^- -излучатели. Кроме того, радиофармацевтические лекарственные препараты (РФЛП) на основе α -частиц позволяют использовать более низкие уровни радиоактивности, на уровне десятков МБк. Пептид-рецепторную терапию с использованием α -излучателей обычно называют таргетной альфа-терапией (ТАТ). Одними из наиболее подходящих для ТАТ радионуклидов являются $^{212,213}\text{Bi}$ и ^{225}Ac . Наибольшее внимание уделяется ^{225}Ac , период полураспада (10 сут) которого подходит для синтеза меченой биомолекулы и её последующего накопления в опухоли после введения даже в случае длительно циркулирующих в организме

моноклональных антител. Среди медицинских изотопов висмута предпочтение отдается ^{213}Bi с периодом полураспада 46 мин в силу отсутствия в силу отсутствия среди дочерних продуктов его распада высокоэнергетичного гамма-излучения. Ввиду относительно короткого периода полураспада применение ^{213}Bi возможно в случае, когда необходима быстрая доставка радионуклида к раковой клетке, например, для лечения лейкемии или локального воздействия при глиомах и раке мочевого пузыря; также возможно использование ^{213}Bi с короткими пептидами, которые характеризуются быстрым метаболизмом.

Кроме радионуклида и таргетной биомолекулы в состав конъюгата входит лиганд, который обеспечивает связь с биомолекулой и способен прочно удерживать радионуклид. Поэтому помимо подбора таргетной биомолекулы и радионуклида большую роль играет выбор лиганда. Он должен быстро связывать радионуклид с образованием устойчивого комплекса: от этого напрямую зависит эффективность диагностики и лечения. В качестве таких лигандов обычно используют полиаминокарбоновые кислоты H_4DOTA и H_5DTPA (структурные формулы и номенклатурные названия представлены на стр. 9). Макроциклический лиганд 12-азакраун-4 H_4DOTA часто используется в РФЛП на основе коротких пептидов, поскольку комплексообразование с H_4DOTA в течение 5-30 мин требует повышенных температур. Этот факт усложняет процедуру синтеза меченой биомолекулы, если она чувствительна к нагреванию (как, например, антитела), либо необходимо проводить очистку от фракции несвязанного катиона. В противоположность H_4DOTA ациклический лиганд H_5DTPA быстро связывает катионы при комнатной температуре, но образующиеся с ним комплексы постепенно диссоциируют *in vitro* и *in vivo*, что ухудшает качество диагностики и приводит к дополнительной дозовой нагрузке на здоровые ткани. Последнее наиболее актуально в случае высокотоксичного альфа-излучения. В связи с чем получение в течение нескольких минут с высокими выходами высокоустойчивых комплексных соединений с альфа-эмиттерами Bi^{3+} и Ac^{3+} остается актуальной проблемой современной ядерной медицины.

Новый бензоазакраун-лиганд H_4BATA обладает большим размером макроцикла по сравнению с 12-краун-4 макроциклом H_4DOTA , что приводит к большей подвижности структуры. В то же время макроциклический эффект должен способствовать образованию более устойчивых комплексов по сравнению с ациклическими лигандами. Таким образом, данный лиганд может сочетать в себе свойства макроциклических и ациклических лигандов. Настоящая работа посвящена исследованию комплексообразующих характеристик H_4BATA по отношению к катионам Bi^{3+} , Ac^{3+} и La^{3+} , определению

эффективности радиоактивного мечения лиганда H_4BATA , стабильности радиоактивных комплексов *in vitro* и их биораспределение в организме здоровых мышей.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы было установление комплексообразующих свойств нового бензоазакраун-лиганда H_4BATA по отношению к катионам Bi^{3+} и Ac^{3+} для использования в составе таргетных радиофармпрепаратов.

В рамках работы решались следующие **задачи**:

1. Определение констант протонирования лиганда H_4BATA ;
2. Определение констант устойчивости комплексов Bi^{3+} и Ac^{3+} с лигандом H_4BATA как стандартным методом потенциметрического титрования, так и методами конкурентных реакций с использованием следовых количеств комплекса;
3. Исследование структуры комплексов Bi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA методами спектроскопии протяжённой тонкой структуры рентгеновского поглощения (EXAFS) и квантово-химических расчётов;
4. Разработка условий синтеза и анализа радиохимической чистоты комплексов с радионуклидами Bi^{3+} и Ac^{3+} ;
5. Оценка кинетической стабильности *in vitro*: в среде конкурентных ионов (в т.ч. биологически значимых) и сыворотке крови;
6. Исследование биораспределения и кинетической стабильности комплексов Bi^{3+} и Ac^{3+} с лигандом H_4BATA в организме здоровых мышей.

Научная новизна работы

1. Впервые показано, что ацетатные 18-краун-6 эфиры, комбинируя в себе свойства известных макроциклических и ациклических лигандов, могут эффективно связывать катионы Bi^{3+} и Ac^{3+} для радиофармацевтического применения;
2. Показана кинетическая стабильность комплексных соединений нового бензоазакраун-лиганда H_4BATA с катионами Bi^{3+} и Ac^{3+} , определены высокие константы устойчивости этих комплексов, показана высокая эффективность радиоактивного мечения H_4BATA радионуклидами висмута и актиния в «мягких» условиях ($25^{\circ}C$, 1-3 мин) и описаны предполагаемые структуры образующихся комплексов;
3. Со следовыми количествами (фмоль) комплекса определены константы устойчивости $[AcDOTA]^{-}$ и $[AcBATA]^{-}$, что представляет особую ценность ввиду дефицита данных по константам устойчивости комплексов с Ac^{3+} в целом, и комплексов Ac^{3+} с лигандами для радиофармацевтического применения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Лиганд H_4BATA со структурой макроцикла 18-краун-6 и четырьмя боковыми ацетатными группами эффективно координирует катионы Bi^{3+} и Ac^{3+} даже при низких значениях pH при комнатной температуре, обеспечивая высокую кинетическую инертность образуемых комплексов в среде конкурентных катионов и в сыворотке крови, и низкое накопление в здоровых тканях организма мышей.
2. Константы устойчивости комплекса H_4BATA с Bi^{3+} не уступают, а с Ac^{3+} превосходят соответствующие константы устойчивости комплексов этих катионов с H_4DOTA , в результате чего радиоактивное мечение происходит при меньшей концентрации лиганда.
3. Высокая кинетическая стабильность комплекса Bi^{3+} с H_4BATA *in vitro* и низкое накопление *in vivo* обусловлены высокой инертностью форм $[BiBATA]^-$ и $[BiHBATA]$.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Показано, что структура макроцикла 18-краун-6 с ацетатными координирующими группами эффективно координирует крупные катионы Bi^{3+} и Ac^{3+} с образованием кинетически стабильных комплексов, что может быть использовано для разработки новых лигандов для связывания других крупных катионов металлов 6, 7 периодов.
2. Установлена высокая скорость образования инертных комплексов с бензоазатетраацетатом H_4BATA с катионами Bi^{3+} и Ac^{3+} . Лиганд H_4BATA может быть использован для создания РФЛП на основе биомолекул, специфичных к рецепторам на поверхности раковых клеток.

Методология и методы исследования. В работе использовались современные инструментальные методы исследования: гамма-спектрометрия, жидкостная сцинтилляционная спектроскопия, цифровая радиография, масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой ИСП-МС, спектрофотометрия, а также потенциометрическое титрование, жидкостная экстракция, тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная 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 меченных соединений; методы радиохимического анализа; автордиография; метод радиоактивных индикаторов; химические аспекты использования радионуклидов в биологии и медицине.

Степень достоверности. Достоверность результатов определяется использованием современных инструментальных методов и подтверждается высокой сходимостью параллельных исследований и сравнением с холостым опытом.

Личный вклад автора состоит в критическом обзоре литературных данных; потенциометрическом титровании лиганда и его комплексов с катионами металлов; определении констант устойчивости комплексов с катионами висмута и актиния методом потенциометрического титрования и конкурирующих реакций (экстракция); разработке условий синтеза комплекса и анализа радиохимической чистоты методом ТСХ; дизайне и проведении эксперимента по исследованию образования и диссоциации комплексов методом УФ-спектроскопии, разработка механизма протон-ассоциированной диссоциации; подборе условий эксперимента и приготовление образцов для анализа методом EXAFS и интерпретации полученных данных; проведении экспериментов по оценке кинетической стабильности *in vitro* и интерпретации данных; планировании, подготовке экспериментов *in vivo* с лабораторными мышами, сборе и анализе полученных данных; непосредственном участии в квантово-химическом моделировании строения комплексов; 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: Международный симпозиум по комплексам с металлами (ISMEC) 2019, Дебрецен, Венгрия; III Международная научно-практическая конференция "Радиофарма-2019" Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов, 2019, Москва, Россия; XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2022", 2022, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; Всероссийская конференция с международным участием «Радиохимия 2022», 2022, Санкт-Петербург, Россия; «III Объединенный Научный Форум Физиологов, Биохимиков И Молекулярных Биологов», 2022, Сочи, Россия; Международная конференция «20th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals», 2022, Верона, Италия.

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 10 печатных работах, в том числе 4-х статьях, опубликованных в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (RSCI, Web of Science и Scopus), а также 6 тезисах докладов на российских и международных научных конференциях:

1. **E.V. Matazova**, B.V. Egorova, E.A. Konopkina, G.Y. Aleshin, A.D. Zubenko, A.A. Mitrofanov, K.V. Karpov, O.A. Fedorova, Y.V. Fedorov, S.N. Kalmykov. Benzoazacrown

- compound: a highly effective chelator for therapeutic bismuth radioisotopes // *MedChemComm*, 2019, Vol. 10, № 9, P. 1641–1645.
2. B.V. Egorova, **E.V. Matazova**, G.Y. Aleshin, A.D. Zubenko, A.V. Pashanova, E.A. Konopkina, A.A. Mitrofanov, A.A. Smirnova, A.L. Trigub, V.A. Karnoukhova, O.A. Fedorova, S.N. Kalmykov. Investigating the Bismuth Complexes with Benzoazacrown Tri- and Tetra-Acetates // *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2021, Vol. 2021, № 33, P. 3344-3354.
 3. **E.V. Matazova**, B.V. Egorova, A.D. Zubenko, A.V. Pashanova, O.A. Fedorova, S.N. Kalmykov. Thermodynamic and kinetic features of Bi³⁺ complexes with aza-macrocycles H₄BATA and H₄DOTA // *ChemistrySelect*, 2022, Vol. 7, №44, P. e202203108.
 4. **E.V. Matazova**, B.V. Egorova, A.D. Zubenko, A.V. Pashanova, A.A. Mitrofanov, O.A. Fedorova, S.V. Ermolaev, A.N. Vasiliev, S.N. Kalmykov. The insights into Actinium complexes with tetraacetates - AcBATA vs AcDOTA: thermodynamic, structural and labeling properties // *Inorganic Chemistry*, 2023, Vol. 62, №31, P. 12223–12236.

1. Обзор литературы

1.1 РФЛП терапевтического назначения

Ядерная медицина — быстро развивающаяся междисциплинарная область, основанная на использовании радиоактивных нуклидов в диагностических и терапевтических целях. Особое место в ней занимает таргетная радионуклидная терапия, в которой для доставки радионуклида используется молекула, имеющая сродство к раковым клеткам, за счёт чего радионуклид преимущественно накапливается в раковой клетке. В результате распада радионуклида ИИ повреждает ДНК в ядре раковой клетки, тем самым останавливая её рост и деление. Радиофармацевтический лекарственный препарат (РФЛП) – лекарственный препарат, который в готовой для использования форме содержит один или несколько радионуклидов.

В РФЛП терапевтического назначения радионуклид несёт в себе основную терапевтическую функцию, но он должен быть доставлен непосредственно в орган-мишень для локализации дозы облучения в поражённой биологической ткани с минимальным побочным облучением окружающих здоровых клеток и органов [2]. Для радионуклидной терапии могут быть использованы различные эмиттеры:

- α -излучатели, характеризующиеся высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ) α -частиц (80-100 кэВ/мкм) и коротким пробегом (50-90 мкм) [3];
- β^- -излучатели с энергиями β^- -частиц 200-2000 кэВ [2];
- излучатели оже-электронов, характеризующиеся более высокой линейной передачей энергии электронов по сравнению с β^- -частицами (4-26 кэВ/мкм) и очень коротким пробегом (< 130 нм) [4].

На выбор радионуклида влияет несколько факторов: период полураспада, тип и энергия испускаемых частиц, химические свойства, доступность.

РФЛП должен быть разработан таким образом, чтобы максимальная доза облучения должна приходиться на пораженные заболеванием клетки, а здоровые клетки должны подвергаться минимальному воздействию ионизирующего излучения (ИИ). Как правило, в области ядерной медицины используют радионуклиды с периодом полураспада от минут до нескольких дней.

Выбор радионуклида может определяться в том числе характером патологического процесса. Например, для крупных очагов предпочтительнее использовать РФЛП с β^- -излучателями (кастрационно-резистентный рак предстательной железы, лейкемия, острый миелоидный лейкоз, нейроэндокринные опухоли и др. [5]), а для отдельных небольших образований, метастаз - α -излучатели (метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы, рецидивирующая CD-22-положительная неходжкинская лимфома, метастазы в кости и др. [6]).

На сегодняшний день β^- -излучатели продолжают успешно использовать для таргетной терапии, в основном из-за их доступности и удобных ядерно-физических характеристик: например, из-за относительно больших пробегов в биологических тканях отпадает необходимость попадания молекулы с β^- -излучателем в каждую клетку-мишень. В то же время, поскольку ЛПЭ β^- -частиц не такая высокая, для обеспечения терапевтической дозы пациенту надо вводить большие количества РФЛП, чтобы достичь нужной активности радионуклида в каждом очаге поражения, что может привести к кумулятивной перекрестной дозе для всех клеток-мишеней, в том числе и здоровых [7].

Короткий радиус действия α -электронов требует их непосредственной близости к мишени (молекуле ДНК внутри ядра клетки) для достижения терапевтического эффекта, учитывая, что только размеры клетки составляют десятки мкм [8]. Так, например, было проведено сравнение эффективности ^{125}I (наиболее изученный излучатель α -электронов) и ^{131}I в форме тимидина или его аналога 5-[^{125}I]I-2'-дезоксисуридина. Для этого исследовали влияние данных изотопов йода на выживаемость клеток и хромосом клеточной линии V79 китайских хомячков. Было обнаружено, что ^{125}I обладал большей цитотоксичностью за счёт включения в ядро и разрушения ДНК [9]. Также в настоящее время разрабатываются модульные нанотранспортеры (искусственные полипептиды, состоящие из нескольких модулей, которые распознают клетку-мишень, запускают их последующую эндосомолитическую интернализацию, высвобождаются из эндосом и транспортируют радионуклид в ядро) с аффибоды anti-EGFR (EGFR – рецептор эпидермального фактора роста), связанные с ^{111}In . Было показано, что доставка осуществляется не просто внутрь клетки, но и внутрь ядра для максимального приближения к ДНК, и данные нанотранспортёры являются перспективными таргетными препаратами для терапии рака, характеризующегося гиперэкспрессией EGFR (рак предстательной железы, лёгких, толстой кишки и др.) [10].

α -Частицы обладают высокой энергией и способны вызывать большее число нерепарируемых двунитевых разрывов ДНК. Было подсчитано, что для достижения

вероятности гибели одной клетки в 99,99% требуются десятки тысяч β^- -распадов, тогда как только несколько α -распадов на клеточной мембране обеспечивают такую же вероятность гибели [11]. В то же время нет необходимости доставки α -излучателя непосредственно внутрь ядра клетки-мишени в отличие от излучателей оже-электронов, т.к. пробег α -частиц сопоставим с размером клетки.

Для ТАТ разрабатываются РФЛП на основе α -излучателей: ^{225}Ac , ^{213}Bi , $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$, ^{227}Th , ^{223}Ra , ^{211}At , и ^{149}Tb [12]. Однако в этом ряду только препарат на основе ^{223}Ra (^{223}Ra]RaCl₂, Xofigo, Bayer) для терапии костных метастаз при раке предстательной железы прошёл все 4 фазы клинических испытаний [13] и широко применяется на практике. До II фазы клинических испытаний дошли препараты ^{211}At (конъюгат с анти-BC8-B10, имеющим сродство к CD45 рецепторам для лечения лейкемии [14]), ^{213}Bi (конъюгат с анти-CD33 IgG (HuM195), имеющим сродство к CD33 рецепторам для терапии миелоидных злокачественных новообразований [15]), ^{225}Ac (конъюгат с анти-CD33 IgG (HuM195), имеющим сродство к CD33 рецепторам для терапии миелоидных злокачественных новообразований [16]).

Именно ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{211}At чаще всего выбирают в качестве α -излучателей. Все они обладают подходящими ядерно-физическими характеристиками. Для получения меченого конъюгата с биомолекулой с химической точки зрения с катионами металлов Ac^{3+} и Bi^{3+} осуществить комплексообразование проще, чем связать ^{211}At , который относится к группе галогенов.

^{213}Bi ($T_{1/2} = 46$ мин) удобно получать генераторным способом из ^{225}Ac . Наиболее популярный генератор создан на основе смолы AG-MP 50 - так называемый «прямой» генератор, где материнский радионуклид ^{225}Ac прочно удерживается сорбентом, а ^{213}Bi элюируется различными комплексообразователями [17, 18]. Помимо этого также используются генераторы на основе смол Ac-resin (Triskem int) – «прямой» генератор и UTEVA (Triskem int) – «обратный» генератор [19].

^{225}Ac ($T_{1/2} = 10$ сут) преимущественно получают из генератора на основе ^{229}Th ($T_{1/2} = 7340$ лет). ^{229}Th выделяют из запасов ^{233}U ($T_{1/2} = 1,6 \cdot 10^5$ лет) (Рисунок 1), большая часть из которого была произведена в период с 1954 по 1970 год путём нейтронного облучения ^{232}Th , но не была полностью использована [20]. Однако с растущей потребностью ^{225}Ac для терапии приходится искать альтернативные способы получения ^{225}Ac . Можно получать ^{225}Ac путём облучения природного ^{232}Th протонами высоких энергий (выше 70 МэВ) по реакции скалывания $^{232}\text{Th}(p, x)^{225}\text{Ac}$, однако сечение реакции небольшое и лишь некоторые

из существующих ускорителей могут обеспечить пучок протонов столь высокой энергии и крупномасштабное производство ^{225}Ac [21]. Кроме того, в таком способе нарабатывается долгоживущий ^{227}Ac , который является химически неотделимой примесью. Альтернативный путь получения ^{225}Ac заключается в облучении мишеней ^{226}Ra . Облучение ^{226}Ra с использованием ускорителей электронов $^{226}\text{Ra}(\gamma, n)^{225}\text{Ra}$ позволяет получать ^{225}Ac с генератора $^{225}\text{Ra}/^{225}\text{Ac}$, однако данная реакция требует использования установки со значительно более высоким током [20]. Также есть перспективный метод получения ^{225}Ac по реакции $^{226}\text{Ra}(p, 2n)^{225}\text{Ac}$ протонами низких энергий с высоким сечением, что можно осуществить на многих низкоэнергетических циклотронах, которые уже используются во всем мире для производства медицинских изотопов. Хотя реакции на ядрах ^{226}Ra обладают наибольшим потенциалом для производства ^{225}Ac , трудности и затраты, связанные с получением мишени, являются существенным недостатком [22]. Тем не менее, разработка методов получения ^{225}Ac становится всё более важной задачей ввиду большого спроса как ^{225}Ac , так и образующегося из него ^{213}Bi (Рисунок 1).

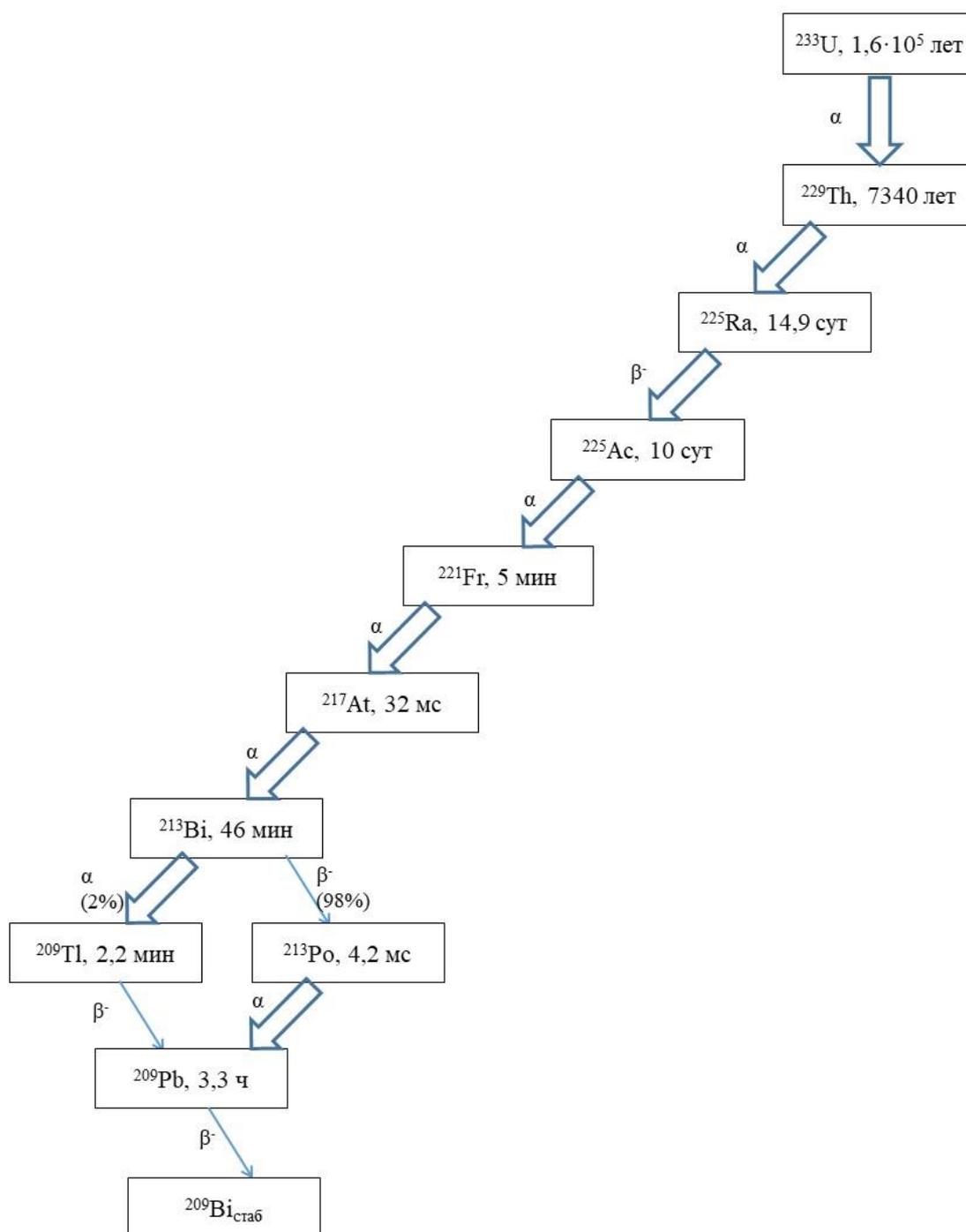


Рисунок 1. Цепочка распада ^{233}U [20].

Таргетная альфа-терапия может использоваться как полностью самостоятельный вид лечения, так и может быть предложена в качестве дополнительной терапии после радикального лечения (например, хирургического вмешательства и химиотерапии) [23]. Также, альфа-терапия может применяться локально в случаях, когда операция невозможна. Отличным примером здесь может послужить меченный ^{213}Bi конъюгат substance P нейрпептид, состоящий из 11 аминокислот, который имеет сродство к NK-1 рецепторам.

Данный конъюгат используют для локальной терапии наиболее агрессивных опухолей мозга в случаях, когда проведение операции уже невозможно: пациенту вводят катетер внутрь опухоли, через который поступает раствор РФЛП [24]. Более того, были получены результаты исследования терапии уже повторно возникающих опухолей, которые ещё более агрессивны и не поддаются лечению стандартными методами. Эти данные свидетельствуют об эффективности локальной терапии с использованием меченного ^{213}Bi конъюгата substance P и увеличении медианы общей выживаемости после рецидива до 10,9 месяцев, что примерно в 3 раза больше, чем при лечении стандартными методами [25]. Также была проведена серия клинических испытаний с тем же препаратом, но на основе ^{225}Ac . Введённая радиоактивность составляла всего 30 МБк. Пациенты хорошо переносили процедуру без значительных побочных симптомов токсичности, и достигалось увеличение медианы общей выживаемости после рецидива до 13,2 месяцев [26]. Ожидается, что испытания будут продолжены на большей выборке пациентов.

Можно отметить также тенденцию последнего времени по замене β^- -излучателей в составе конъюгатов с биомолекулами на α -излучатели. Известен целый ряд β^- -излучающих таргетных радиофармацевтических лекарственных препаратов для лечения рака. Наиболее яркими представителями являются [^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE для лечения нейроэндокринных опухолей [27] и [^{177}Lu]Lu-DOTA-PSMA-617 (конъюгат DOTA с простатспецифическим мембранным антигеном, который экспрессируется в больших количествах в клетках рака предстательной железы и в эпителиальных клетках некоторых других видов рака) для лечения метастазирующего рака простаты [28], которые недавно были одобрены FDA (Food and Drug Administration). Радионуклидная терапия с использованием пептидов, имеющих сродство к рецепторам соматостатина на поверхности раковых клеток – [^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE, а также конъюгат ^{90}Y с октреотидом, признана эффективным терапевтическим методом при лечении неоперабельных или метастатических гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных новообразований или нейроэндокринных опухолей. Данный метод обеспечивает высокие показатели выживаемости без прогрессирования заболевания, которые выгодно отличаются от химиотерапии, а также хорошо переносится пациентами [29]. Однако во многих случаях после такого лечения у раковых клеток вырабатывается резистентность к β^- -излучению. В связи с этим было предложено заменить β^- -излучатель в составе конъюгата на α -излучатель. Полученный РФЛП [^{213}Bi]Bi-DOTA-TOC был исследован на пациентах, предварительно получавших конъюгат октреотида с β^- -излучателем ^{177}Lu [30]. Сканы позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и

компьютерной томографии (КТ) с $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOТА-ТОС}$ (Рисунок 2) позволили сделать вывод [30], что лечение было успешным.

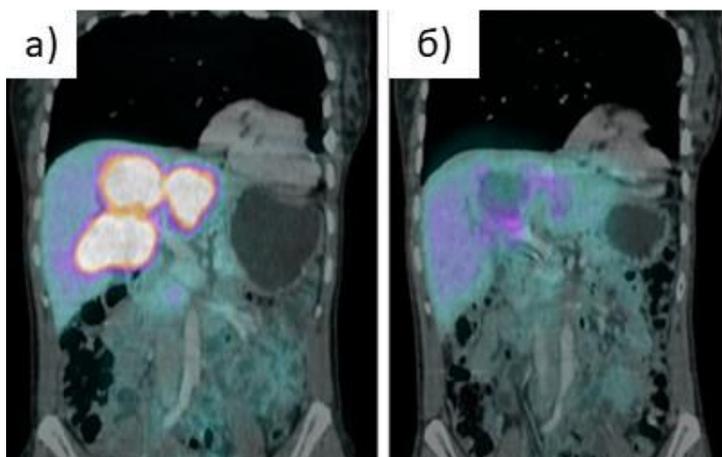


Рисунок 2. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOТА-ТОС}$ ПЭТ/КТ сканы пациента: а) Интенсивное накопление $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOТА-ТОС}$ и контрастного вещества для КТ в очагах опухоли б) ПЭТ-отрицательные морфологически кистозные остаточные явления через 6 месяцев после терапии [30].

Таким образом, на примере $[^{213}\text{Bi}]\text{-DOТА-ТОС}$ было показано, что ТАТ способна преодолевать резистентность к β^- -излучению и ответ на терапию оказывается эффективным и продолжительным.

Сравнение эффективности терапии ^{177}Lu и ^{225}Ac в составе конъюгата с PSMA-617 показало, что клиническая эффективность выше для $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DOТА-PSMA-617}$, чем для $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOТА-PSMA-617}$, хотя и наблюдается более выраженное побочное воздействие на слюнные железы [31]. Как видно из Рисунок 3, ТАТ с $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DOТА-PSMA-617}$, хотя и является экспериментальной на данный момент, она, по всей видимости, имеет большой потенциал для значительного улучшения состояния пациентов с раком предстательной железы на поздних стадиях благодаря механизму действия, недостижимому традиционными методами лечения [32]. Кроме того, уже разрабатываются коммерческие составы лекарственной формы с PSMA: $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DOТА-PSMA-I\&T}$ в соответствии с требованиями GMP [33].

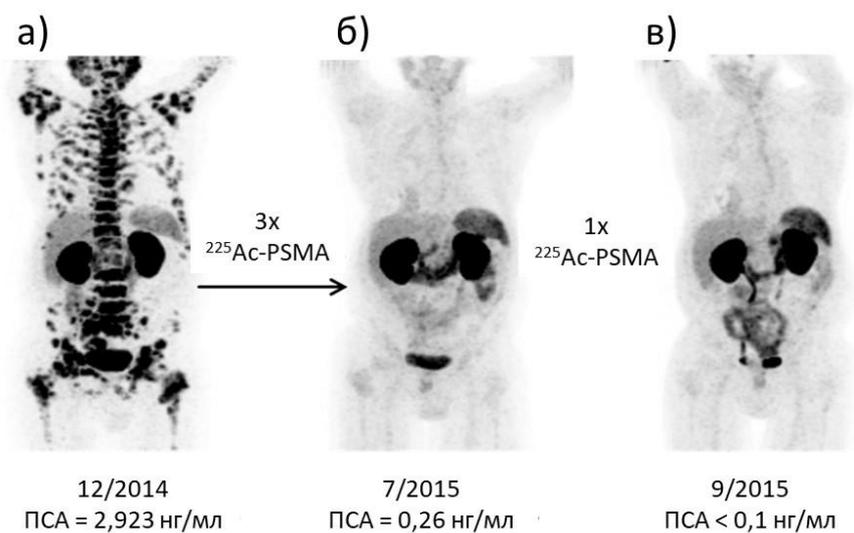
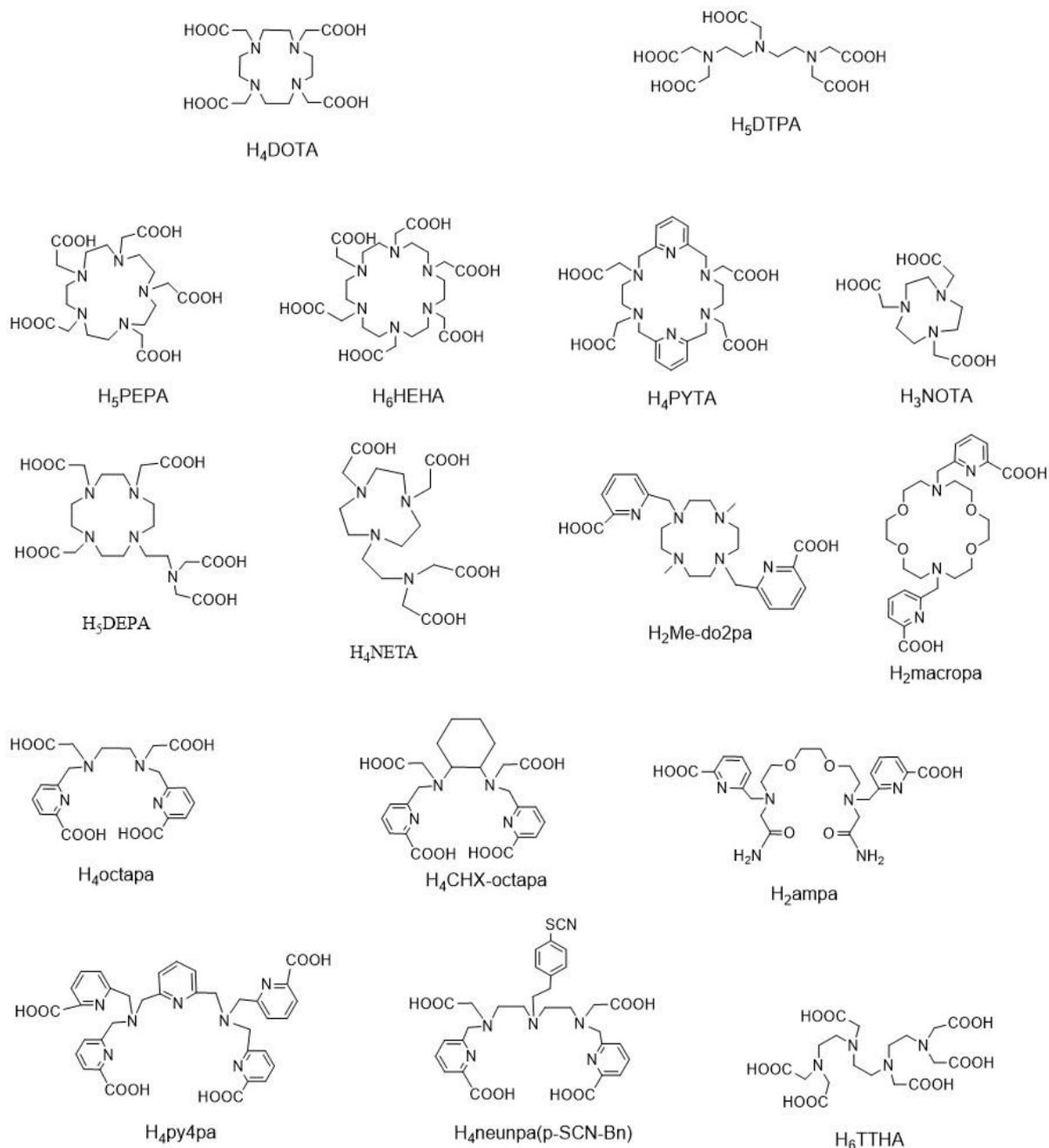


Рисунок 3. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}^{\text{TA}}\text{-PSMA-11}$ ПЭТ/КТ сканы пациента: а) до терапии; б) через 2 месяца после третьего цикла $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DO}^{\text{TA}}\text{-PSMA-617}$; в) через 2 месяца после одного дополнительного цикла $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DO}^{\text{TA}}\text{-PSMA-617}$ [34].

1.2 Лиганды, используемые в составе РФЛП

Ниже представлены структурные формулы лигандов, которые будут обсуждаться в данном разделе, а также фигурируют в разделе «Результаты и обсуждение» (схема 1).

Схема 1. Структурные формулы лигандов, используемых в ядерной медицине.



Преимущество таргетной терапии с использованием биомолекул с точки зрения терапии заключается в селективном воздействии радиоактивного излучения на раковые клетки при минимальном воздействии на соседние здоровые ткани. Однако для осуществления данного подхода необходим тщательный подбор всей системы: радионуклида и биомолекулы, а также лиганда для связывания катиона с биомолекулой. Роль лиганда оказывается особенно важной, поскольку от того, насколько быстро и насколько

устойчивый комплекс с катионом он образует, зависит процесс синтеза и эффективность РФЛП [35].

Одной из проблем на пути к таргетной терапии является разработка подходящих лигандов, обладающих высокой скоростью комплексообразования и образующих кинетически стабильные комплексы в среде организма, где возможно трансхелатирование. Основными лигандами, используемыми в составе РФЛП, являются ациклический полиамин H_5DTPA и макроциклический азакраун-лиганд H_4DOTA . Достоинством H_5DTPA является его высокая скорость комплексообразования с большинством катионов уже при комнатной температуре, что делает его удобным кандидатом для использования с моноклональными антителами, которые чувствительны к нагреванию. Однако его комплексы характеризуются недостаточной кинетической стабильностью *in vivo* [36, 37]. Комплексообразование с H_4DOTA требует нагревания, однако образуются комплексы, кинетически инертные *in vivo*, что делает H_4DOTA наиболее часто используемым лигандом в составе РФЛП таргетного типа для лантаноидов, висмута и актиния [30, 35, 38, 39]. Тем не менее, известно, что в случае такого крупного трёхвалентного катиона как Ac^{3+} , его комплексы с H_4DOTA подвержены диссоциации в среде организма с течением времени [40]. В связи с этим существует потребность в создании лиганда с подходящими для конъюгирования характеристиками: высокой скоростью комплексообразования и устойчивостью комплексов.

В связи с вышеописанным, синтезируют и исследуют другие лиганды как с точки зрения кинетической стабильности образуемых комплексов в биологических средах, так и с точки зрения термодинамики, кинетики и структурных характеристик с целью более глубокого понимания процесса комплексообразования и как эти параметры влияют на дальнейшее поведение радиоактивно меченого комплекса и конъюгата.

Активно предпринимаются попытки модифицирования H_4DOTA : получение хиральных производных [41], исследование влияния замены ацетатных групп амидными и пиридиновыми на кинетику комплексообразования и кинетическую стабильность комплекса, уменьшение числа карбоксильных групп, а также частичная замена атомов азота макроцикла на кислород [42, 43]. Однако комплексообразующие характеристики полученных производных оказываются хуже. Большое исследование термодинамических и кинетических особенностей комплексообразования посвящено производным H_4DOTA с заменой ацетатных групп на фрагменты кислотных остатков фосфорных кислот [44, 45]. Скорость комплексообразования небольшого катиона Cu^{2+} у таких производных несколько выше. Ряд последних исследований посвящён комплексообразованию производных

H_4DOTA с лантаноидами [46 - 48]. Однако некоторого улучшения комплексообразующих характеристик для связывания Bi^{3+} удалось достичь лишь в случае производного $\text{H}_2\text{Me-do2pa}$ с двумя пиколинатными группами вместо ацетатных и двумя метильными вместо двух других ацетатных групп. $\text{H}_2\text{Me-do2pa}$ связывал Bi^{3+} быстрее H_4DOTA при 25°C (схема 1) [49]. Несмотря на более низкое значение pBi ($pM = -\lg[M^{m+}]_{\text{своб}}$, рассчитывается с использованием значений констант устойчивости комплекса, констант протонирования лиганда и гидролиза катиона), которое указывает на более низкую термодинамическую устойчивость комплекса, продемонстрирована стабильность $[\text{Bi}(\text{Me-do2pa})]^+$ в сыворотке крови в течение по крайней мере 2 ч. Учитывая небольшой период полураспада ^{213}Bi , стабильности комплекса в течение 2 ч может быть достаточно, если для последующей конъюгации используется биомолекула, которая успевает связаться с клеткой-мишенью за это время. Однако, желательно обладать бóльшим запасом времени, в течение которого комплекс стабилен. Дальнейших исследований конъюгатов с лигандом $[\text{Bi}(\text{Me-do2pa})]^+$ обнаружено не было.

Помимо лигандов H_5DTPA и H_4DOTA для использования в качестве компонентов РФЛП рассматриваются и другие лиганды, такие как, например, H_3NOTA (схема 1). Данный лиганд показал высокую эффективность и селективность связывания относительно небольших двухзарядных катионов Cu^{2+} и Zn^{2+} благодаря меньшему размеру макроцикла 9-краун-3 [50], а также Ga^{3+} [51]. Исследуются также производные H_3NOTA с заменой ацетатных координирующих групп на пиколинатные в качестве более подходящих лигандов для Sc^{3+} по сравнению с H_4DOTA . Получение комплекса Sc^{3+} с H_4DOTA требует нагревания, что усложняет его использование с биомолекулами. В то же время, производные H_4DOTA , образующие комплекс без нагревания, склонны к образованию кинетически лабильных «внеклеточных» («out-of-cage») конформаций комплексов, где катион Sc^{3+} координируется боковыми карбоксильными группами, не входя в макроциклическую полость лиганда и, как следствие, более лабилен. Производное H_3NOTA с одной пиколинатной группой продемонстрировало высокую скорость комплексообразования и устойчивость комплекса со Sc^{3+} [52]. Для более крупных трёхзарядных катионов лантаноидов, Ac^{3+} и Bi^{3+} данный лиганд не подходит.

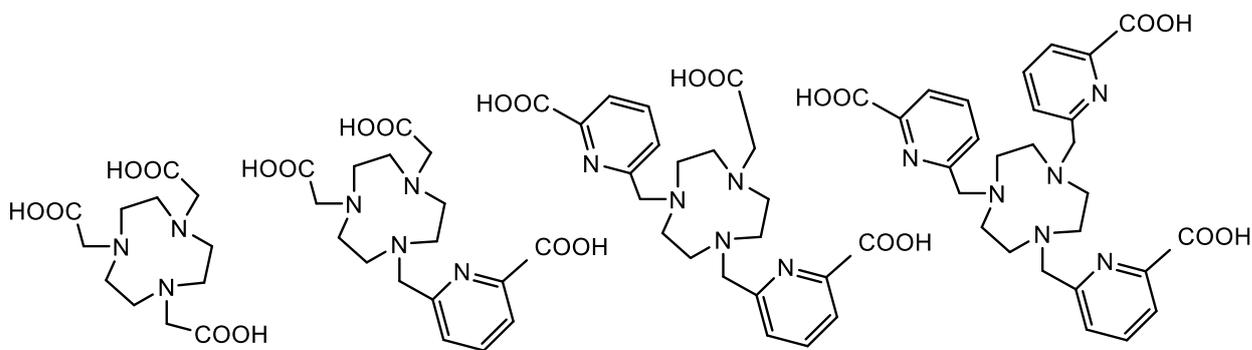


Рисунок 4. Структура лиганда H_3NOTA и его пиколинатных производных.

Наоборот, лиганд H_6HENA (схема 1) обладает большим размером макроцикла с полостью 18-краун-6. Известный диаметр полости 18-краун-6 составляет 2,6–3,2 Å [53]. Комплекс $[^{225}Ac]AcHENA^{3-}$ показал высокую стабильность *in vivo*. Сравнительный анализ комплексов ^{225}Ac с лигандами H_4EDTA , H_5DTPA и H_5PEPA (схема 1) продемонстрировал значительное накопление ^{225}Ac в печени в случае данных комплексов, в то время как большая часть комплекса $[^{225}Ac]AcHENA^{3-}$ выводилась через 1 ч после введения посредством почек [40]. Тем не менее, при дальнейшем исследовании стабильности конъюгата H_6HENA с моноклональным антителом в сыворотке крови, через 5 ч оставалось всего 66-69 % конъюгата, а через сутки его было уже менее 50 % [54].

Заслуживает рассмотрения также лиганд H_4PYTA с пиридиновыми группами, встроенными в макроцикл. Константы устойчивости данного комплекса с лантаноидами оказываются довольно высокими и, кроме того, говорится о более низкой токсичности комплекса $[GdPYTA]^-$ в мышцах по сравнению с $[GdDTPA]^{2-}$ и $[GdDOTA]^-$ [55]. Несмотря на то, что исследований конъюгатов с биомолекулами на основе H_4PYTA проведено не было, введение пиридиновых групп в структуру макроцикла выглядит удачным решением, и данный лиганд может служить базой для получения производных с подходящими характеристиками комплексообразования.

Из последних исследований новых лигандов важно упомянуть работу по обширному исследованию структуры и устойчивости комплексов Ac^{3+} с лигандом $H_2masгopа$ (схема 1), который также обладает большим размером макроцикла со структурой 18-краун-6. Как комплекс, так и меченный конъюгат этого лиганда с антителом трастузумаб показал высокую стабильность в сыворотке крови при высокой скорости связывания ^{225}Ac , а меченный ^{225}Ac конъюгат с биомолекулой RPS-070 (молекула, имеющая сродство как к PSMA, так и к альбумину, разработанная для терапии рака предстательной железы) показал стабильность и накопление в опухолях мышцей [56]. Высокая эффективность связывания

была так же продемонстрирована с ^{223}Ra , а меченный ^{223}Ra конъюгат масгора с пептидом DUPA продемонстрировал стабильность в организме здоровых мышей [57].

Ещё одним представителем макроциклических лигандов выступает H_5DEPA . В работе [58] отмечается низкая скорость образования комплекса $[\text{}^{177}\text{Lu}]\text{LuDEPA}^{2-}$, но было зафиксировано, что комплекс был кинетически стабилен в сыворотке. В случае же Bi^{3+} была продемонстрирована высокая скорость образования $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{BiDEPA}^{2-}$, и отмечается стабильность в сыворотке и *in vivo*. Наличие дополнительной хелатирующей аминодиацетатной группы вместо ацетатной в H_4DOTA , по-видимому, значительно способствует повышению скорости связывания катиона. В случае меченных конъюгатов данного лиганда $[\text{}^{90}\text{Y}]\text{Y-3p-C-DEPA-trastuzumab}$ и $[\text{}^{177}\text{Lu}]\text{Lu-3p-C-DEPA-trastuzumab}$ наблюдалась низкая скорость связывания радионуклида, к тому же значительная часть меченого конъюгата (35% для конъюгата с ^{90}Y и 45% - с ^{177}Lu) диссоциировала в сыворотке [59]. Возможно, это различие объясняется влиянием моноклонального антитела в случае конъюгатов с 3p-C-DEPA, несмотря на дистанцирование хелатирующей группы.

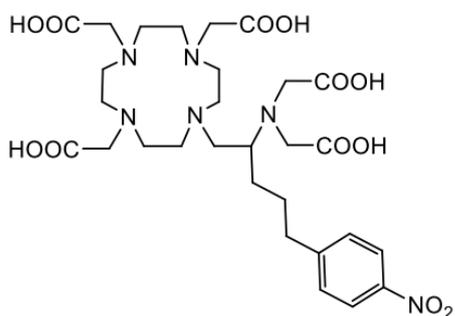


Рисунок 5. Структура лиганда 3p-C-DEPA.

Помимо макроциклических лигандов, которые структурно близки с исследуемым лигандом H_4BATA , для связывания катиона металла в РФЛП также часто рассматривается другой класс лигандов – ациклические лиганды с пиколинатными координирующими группами, например $\text{H}_4\text{остара}$ [60][61], $\text{H}_2\text{амра}$ [62], $\text{H}_4\text{ру4ра}$ [63], $\text{H}_4\text{неупра}$ [64, 65], и их производные (схема 1). Из-за подвижности ациклической структуры, данные лиганды быстро связывают катион, и традиционно характеризуются высокими константами устойчивости. Однако высокие константы устойчивости в случае представленных лигандов не всегда коррелируют с кинетической стабильностью в биологических средах. В обсуждении результатов этот аспект будет обсуждаться подробнее и в каждом подразделе будет проведено сравнение конкретных характеристик комплексов с H_4BATA с данными лигандами.

Среди лигандов с пиколилатными координирующими группами стоит отметить $H_4neupra$. В работе [64] авторы исследовали комплексообразование $H_4neupra$ с La^{3+} , Bi^{3+} и In^{3+} . Константы устойчивости комплексов $H_4neupra$ с данными катионами сопоставимы с соответствующими значениями для комплексов с H_4DOTA . На примере комплекса со ^{111}In продемонстрирована стабильность комплекса в сыворотке крови в течение 5 сут, а также низкое накопление в органах спустя 1 сут, в связи с чем утверждается стабильность комплекса *in vivo*. Также в работе [65] был получен конъюгат $H_4neupra$ с Bi^{3+} , селективный к рецептору MC1R, что может быть использовано для терапии меланомы. Полученный конъюгат стабилен в сыворотке крови по крайней мере в течение 2 ч, однако результаты исследования стабильности *in vivo* не так однозначны. Накопление в опухоли было составило $5,91 \pm 1,33$ % введ.д./г (% введённой дозы на 1 г органа) через 1 ч. Желая улучшить полученный результат, авторы получили конъюгат $H_4neupra$ с большей длиной линкера и использовали ^{111}In вместо ^{213}Bi ввиду большего периода полураспада (2,8 сут). Это значительно повлияло как на накопление в тканях организма, так и на профиль биораспределения спустя. Из-за большей липофильности конъюгата, наблюдалось значительное накопление в печени $31,5 \pm 4,99$ % введ.д./г спустя 1 сут после введения, а накопление в селезёнке было ещё больше. Таким образом, подбор линкера существенно влияет на поведение конъюгата в организме, и авторы планируют продолжить работу в этом направлении.

Лиганд H_4ru4pa похож на $H_4neupra$, однако две ацетатные группы у него заменены на пиколилатные. Таким образом, четыре пиколилатные группы соединены между собой пиридиновым мостиком. Авторы [63] получали конъюгат с антителом trastuzumab, меченый ^{225}Ac . Было установлено, что конъюгат на основе H_4ru4pa стабилен в сыворотке крови в течение 10 дней. Профиль биораспределения *in vivo* полученного конъюгата был аналогичен конъюгату на основе H_4DOTA . При этом накопление в здоровых тканях было ниже в случае конъюгата с H_4ru4pa , а максимальное накопление в опухоли наблюдалось через 6 дней ($36,9 \pm 11,1$ % введ.д./г), что можно назвать хорошим результатом.

Для связывания Bi^{3+} удачными лигандами предварительно можно назвать $H_4ocrapa$ и $H_4CHXocrapa$. Они отличаются от $H_4neupra$ меньшим размером и числом донорных атомов азота. Полное связывание $^{205/206}Bi$ в комплекс с $H_4ocrapa$ или $H_4CHXocrapa$ достигалось при концентрациях лиганда больше 5 мкМ, при этом полученный комплекс был стабилен в сыворотке крови как минимум в течение 1 сут [61]. Исследований конъюгатов с Bi^{3+} на основе $H_4ocrapa$ и $H_4CHXocrapa$ пока не проведено. В то же время была показана большая лабильность комплекса $[Gd(ocrapa)(H_2O)]^-$ (период полупревращения составил 0,15 ч) по

сравнению с комплексами Gd^{3+} с H_4EDTA и H_4DTPA в физиологических условиях [60], что в целом свойственно комплексам с ациклическими лигандами. Поэтому для связывания Ac^{3+} лиганды $H_4остара$ и $H_4СНХостара$ могут оказаться не самыми удачными кандидатами, и этот вопрос требует отдельного исследования. Другой лиганд с пиколинатными и амидными координирующими группами, $H_2амра$, связывает Ac^{3+} и Bi^{3+} при более низких концентрациях лиганда, чем H_4DOTA , но данных о стабильности комплексов и получении конъюгатов с биомолекулами не представлено [62].

Несмотря на то, что ациклические лиганды с пиколинатными заместителями это несколько иной класс лигандов, сравнение $H_4ВАТА$ с ними представляет интерес ввиду подвижности макроцикла $H_4ВАТА$, что делает его в некоторых аспектах похожим на ациклические лиганды (будет обсуждаться далее), а также потому, что данный класс активно исследуется, и уже накоплено значительное количество данных по их комплексообразованию с Bi^{3+} и Ac^{3+} .

1.3 Физикохимические особенности процесса комплексообразования

Определение термодинамических констант устойчивости комплексов металла с лигандом позволяет предположить возможность принципиального образования комплекса, предварительно оценить дальнейшую стабильность комплекса в биологических средах, а также сравнивать комплексы друг с другом. Тем не менее в последнее время отмечаются проблемы, связанные с определением констант устойчивости комплексов. Рутинно используемый метод определения констант устойчивости в водных растворах рН-диапазона – метод потенциометрического титрования [66]. Одна из проблем связана с ограничениями и ошибками данного метода. Так, в работе [50] исследовано комплексообразование H_3NOTA с Cu^{2+} . Отмечается, что в случаях, когда титрование проводится в среде электролитов с Na^+ и K^+ депротонированная форма лиганда образует комплексы с катионами фонового электролита в процессе потенциометрического титрования, что вносит ошибку в определение константы протонирования лиганда и устойчивости комплексов с H_3NOTA [67, 68]. Это приводит к занижению истинных значений констант протонирования и комплексообразования. Подобный эффект наблюдается и при определении констант протонирования и комплексообразования лиганда H_4DOTA , поскольку катион электролита способствует депротонированию лиганда [69]. Таким образом, в литературе приводят разный набор констант протонирования H_4DOTA [69, 70 - 72]. Одновременно с этим катионы электролита являются также

катионами микроэлементов, и параметры комплексообразования с ними дают больше информации о возможном поведении комплексов в биологических средах.

Другая проблема связана с ограничением применимости метода потенциометрического титрования для комплексов, которые образуются уже при $pH < 2$. Предельные значения pH возникают из-за того, что определение констант комплексообразования в системе металл-лиганд этим методом возможно, если металл и лиганд участвуют в протон-зависимых реакциях: гидролиза, протонирования. По изменению содержания протонов можно понять, влияют ли еще какие-то реакции помимо реакций гидролиза катиона и протонирования лиганда на равновесное значение pH . Поэтому при низких значениях pH , когда содержание протонов достаточно высокое, достоверно определить небольшие изменения в их содержании сложно, и, следовательно, содержание равновесных форм комплекса тоже. Гипотетически, для этого можно пробовать использовать на порядки большие концентрации катиона и лиганда (больше мМ). Однако, например, в случае Bi^{3+} , возникнет проблема с растворимостью висмута. Растворимость лиганда в воде также ограничена. В этом случае, для правильного расчёта константы устойчивости метод потенциометрического титрования может быть дополнен другими: например, методом спектрофотометрического или ЯМР титрования [50], а также методами конкурентных реакций.

В случае медленного комплексообразования также возникает проблема в определении констант устойчивости методом потенциометрического титрования. Это показано на примере комплекса Sc^{3+} с H_4DOTA : в этом случае использовали метод "out-of-cell" титрования [72]. В этом методе в ходе титрования для каждой точки раствор достают из ячейки с электродом, нагревают до температуры $90^{\circ}C$ до достижения равновесия, затем охлаждают до температуры титрования и снова помещают в ячейку. Другой подход заключается в том, чтобы оставить раствор при комнатной температуре до тех пор, пока не будет достигнуто равновесие, но такой подход оказывается очень времязатратным, при этом необходима фиксация параметров окружающей среды на длительный срок, а также присутствует проблема определения выхода на равновесие [49]. По-видимому, подобные манипуляции увеличивают погрешность получаемых констант устойчивости. Альтернативными и более удобными методами определения константы устойчивости в этом случае могут выступать методы конкурентных реакций (экстракция, сорбция, растворимость, тонкослойная хроматография (ТСХ)) [72]. Часто упоминается, в частности, метод FISRE (free-ion selective radiotracer extraction), который основан на экстракции свободного катиона, в то время как комплекс не взаимодействует с экстрагентом. В этом

ключе используется жидкость-жидкостная экстракция или экстракционная хроматография. Например, метод, основанный на распределении между двумя фазами с использованием смолы Chelex, был использован для определения констант устойчивости $[\text{ScDOTA}]^-$ и $[\text{ScDTPA}]^{2-}$ [72], комплексов Sc^{3+} с фосфонатными аналогами H_4DOTA [72] и кинетических параметров диссоциации комплексов Y^{3+} с H_4EDTA , H_5DTPA и $\text{H}_3\text{DOTATOC}$ [73]. Помимо распределения между двумя фазами с использованием смолы Chelex, метод ТСХ также применялся для определения константы устойчивости $[\text{AcDOTA}]^-$ [71].

Упомянутые методы конкурентных реакций (часто упоминаются, в частности, как FISRE - free-ion selective radiotracer extraction [72]) применимы для следовых концентраций, что делает данные методы единственно возможными для определения констант устойчивости с такими катионами, как Ac^{3+} , которые можно использовать лишь в индикаторных количествах [71]. Из-за сложности работы с Ac^{3+} напрямую, определение физико-химических и структурных параметров комплексообразования проводят обычно с макроколичественными аналогами из ряда Ln^{3+} (Ce^{3+} , Eu^{3+} и др.) [42, 56], однако следует с осторожностью переносить полученные данные на комплексообразование с Ac^{3+} . В этой связи методы конкурентных реакций выступают в качестве удачной альтернативы потенциометрическому титрованию. В то же время в литературе на упомянутом примере комплекса Sc^{3+} с H_4DOTA отмечается, что может возникнуть проблема расхождения констант устойчивости, полученных методом конкурентных реакций (со следовыми количествами вещества, концентрации порядка нМ), с константами, полученными традиционным методом потенциометрического титрования (с мМ концентрацией вещества). Сложность здесь кроется в том, что из экспериментов со следовыми количествами вещества рассчитывается суммарная кажущаяся константа устойчивости, которая зависит от pH и включает в себя несколько форм комплекса, что нужно учитывать для расчёта истинных значений констант устойчивости каждой формы [72]. Кроме того, определение кажущихся констант устойчивости в заданных условиях со следовыми количествами комплекса, где конкурентные ионы присутствуют в бóльших количествах, лучше моделирует поведение комплекса в условиях, аналогичных применению РФЛП, поскольку в РФЛП также используются микро- или наномолярные концентрации вещества (для РФЛП на основе β^- - и α -излучателей соответственно). Например, в стандартном цикле терапии с применением $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DOTA-PSMA-617}$ используют активность 4-8 МБк [74]. С учётом периода полураспада ^{225}Ac 10 дней, количество ^{225}Ac и меченого им конъюгата составляет 8-17 пмоль. $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DOTA-PSMA-617}$ вводится внутривенно в физиологическом растворе (0,9 % NaCl) объёмом порядка от 3-8 мл [75] до 30 мл [76], т.е.

концентрация в растворе составляет 0,5-4 нМ. А в организме конентрация становится ещё ниже – с учётом, что средний объём крови в теле человека составляет 5 л, нМ концентрация понижается до пМ. А при определении константы устойчивости стандартным методом потенциометрического титрования используются концентрации не ниже мМ.

В случае исследования комплексообразования с катионами Bi^{3+} возникает дополнительная сложность, связанная с высокой склонностью к гидролизу свободного Bi^{3+} уже при $\text{pH} > 1$ с образованием полиядерных гидроксо-комплексов [77]. Нерастворимые коллоиды висмута крайне трудно связываются в комплекс, из-за чего константы устойчивости с лигандами, которые медленно образуют комплексы, зачастую приходится определять в средах с высокой ионной силой, что затрудняет их сравнение с другими комплексами [78].

Метод ЯМР-спектроскопии для определения констант устойчивости используется реже, чем метод потенциометрического титрования. Однако исследование методом ЯМР-спектроскопии возможно проводить в растворах при $\text{pH} < 2$, за областью применения потенциометрического титрования. Это позволяет более точно определить значение константы устойчивости комплекса, а также позволяет обнаружить протонированные формы комплекса и определить значения констант устойчивости и для них тоже. Так, например, в работе [72] проводили ^{45}Sc ЯМР титрование в присутствии H_5DTPA и H_4DOTA при $\text{pH} < 2$ в дополнение к стандартному потенциометрическому. Именно при $\text{pH} < 2$ присутствует свободная форма катиона Sc^{3+} , поэтому значение константы устойчивости комплексов удаётся установить наиболее точно. Кроме того, при $\text{pH} < 2$ протонированные формы комплексов $[\text{ScHDTPA}]^-$ и $[\text{ScHDOTA}]$ представлены больше, чем при более высоких значениях pH , их количества измеримы, что также позволяет определить константы устойчивости и для протонированных комплексов тоже.

Помимо термодинамических факторов, кинетика комплексообразования и диссоциации также играет большую роль при выборе лиганда для РФЛП. Скорость образования комплекса (константу скорости реакции) обычно определяют методом электронной спектроскопии в УФ или видимом диапазоне или методом ЯМР-спектроскопии в необходимых для наблюдения условиях: реакция в этих условиях возможна и протекает за подходящее для детектирования время. Например, для того чтобы наблюдать диссоциацию, проводят эксперимент в кислой области, при таких значениях pH , где в равновесии, согласно установленным константам устойчивости, комплекс не должен присутствовать в растворе. Если комплекс находится в растворе с избытком ионов H^+ (или протонов), которые конкурируют за связывание с лигандом, диссоциация комплекса протекает тем быстрее, чем выше концентрация ионов водорода. Это позволяет моделировать процесс

диссоциации, регулируя концентрацию протонов. Помимо этого, для исследования скорости диссоциации или комплексообразования нужен подходящий для наблюдения пик. Поэтому в случае метода ЯМР-спектроскопии измерение спектров чаще всего проводят на ядрах того же элемента, комплексообразование с которым исследуют [79], что бывает трудновыполнимо, но возможно и использование стандартных сигналов протонов [72]. В случае электронной спектроскопии, необходимо определить пик поглощения, по которому будут наблюдать за реакцией: чаще всего это пик комплекса или свободного катиона металла. Но случается, что ни комплекс, ни катион металла не имеют характерных пиков поглощения, и тогда необходимо применять методы для их визуализации. Например, для визуализации катионов висмута можно использовать подход создания среды с высоким содержанием хлорид-ионов, в которой образуется форма $[\text{BiCl}_4]^-$, имеющая характерный пик поглощения при 320 нм [49]. Также можно использовать индикаторы, которые образуют окрашенные комплексы с анализируемым катионом металла, например, Арсеназо III [80]. Данные, полученные при различных концентрациях протона, гидроксид-иона и/или катиона позволяют предположить механизм реакций образования и диссоциации комплекса.

Так, методом ЯМР была исследована кинетика комплексообразования ^{68}Ga с лигандом H_4DOTA и его моноамидным производным. Комплексы продемонстрировали разное сродство к протону и гидроксид-иону, что приводит к отличиям в механизме протон-зависимой диссоциации. Формы комплекса, в которых осуществлялось протонирование не координирующих ацетатных «рук», оставались устойчивыми [79]. В дальнейшем, методом электронной спектроскопии было показано, что увеличение числа амидных групп с уменьшением числа ацетатных приводило к снижению констант протонирования производных H_4DOTA и устойчивости комплексов с лантаноидами, а также к снижению скорости комплексообразования. Исследование кинетики показало, что это, предположительно, обусловлено медленным переходом образующихся на первом этапе дважды протонированных интермедиатов амидных производных в конечную форму [42].

Методом ЯМР-спектроскопии совместно с расчётами структуры методом DFT было детально исследовано комплексообразование Ln^{3+} (на примере Eu^{3+}) с лигандом H_4DOTA и его фосфонатным производным при разных температурах. Было обозначено, что различная структура данных комплексов связана с вращением боковых координирующих групп (ацетатных и фосфонатной) и инверсией кольца, что может привести к различиям в поведении комплекса *in vivo*. Полученные активационные параметры (энтальпия и энтропия активации) позволили сделать вывод, что такое вращение координирующей

боковой группы обусловлено преимущественно энтальпийным фактором [81]. С похожими фосфонатными производными H_4DOTA был проведён расчёт констант комплексообразования и детальное исследование внутрисферных и внешнесферных комплексов Ln^{3+} (на примере Ce^{3+}) методом спектрофотометрии [82]. Внутрисферные комплексы отличаются от внешнесферных тем, что катион металла заходит в полость макроцикла лиганда, и координируется как атомами азота макроцикла, так и боковыми координирующими группами, которые стерически затрудняют доступ молекулам-конкурентам (например, белкам сыворотки крови) к катиону металла. В то время как внешнесферный комплекс координируется преимущественно боковыми координирующими группами (ацетатными, в случае H_4DOTA), что делает катион металла более доступным для связывания с другими молекулами, которые присутствуют в растворе или биологической жидкости. Однако образование внешнесферного комплекса протекает быстрее, чем внутрисферного, поскольку депротонирование боковых групп протекает быстрее. Целью работы [82] было выявить, как меняется устойчивость комплексов и скорость комплексообразования при варьировании дополнительной функциональной группы у фосфатного остатка. Отмечается, что эти группы значительно влияют на выход реакции комплексообразования, поскольку увеличивается устойчивость внешнесферного интермедиата.

Таким образом, всё больше РФЛП направленного действия для терапии, в состав которых входят таргетные биомолекулы, проходят регистрацию и находят своё применение на практике, как Lutathera и Pluvicto на основе бета-излучателя - ^{177}Lu . Кроме того, в сфере разработки РФЛП направленного действия всё чаще исследуются комплексы с альфа-излучателями в составе конъюгатов с пептидами, моноклональными антителами, а также аффибоди. Препараты на основе альфа-излучателей, таких, как, например, ^{213}Bi и ^{225}Ac демонстрируют незначительные побочные эффекты и в ряде случаев демонстрируют более высокую эффективность по сравнению с бета-излучателями, а также могут преодолевать устойчивость некоторых опухолей к бета-излучению ввиду более высоких значений ЛПЭ. Однако используемые в настоящее время лиганды, такие как H_4DOTA и H_5DTPA , которые входят в состав таргетных РФЛП и связывают радионуклид, обладают рядом недостатков, и разработка новых, более подходящих лигандов для катионов Bi^{3+} и Ac^{3+} остаётся актуальной задачей, для решения которой проводятся активные исследования новых видов лигандов. Таким образом, исследователи приходят к пониманию необходимости проведения подробных физико-химических исследований комплексообразования (исследование механизмов диссоциации и комплексообразования, структуры

образующихся комплексов, влияния различных заместителей) с целью разработки подходов к дизайну лигандов определённой структуры, обладающих наиболее подходящими свойствами, и их получению, а также проводятся физико-химические исследования комплексов до их конъюгирования с биомолекулой.

2. Экспериментальная часть

2.1 Оборудование и материалы

Ниже приведены структурные формулы исследуемых лигандов (Рисунок 6).

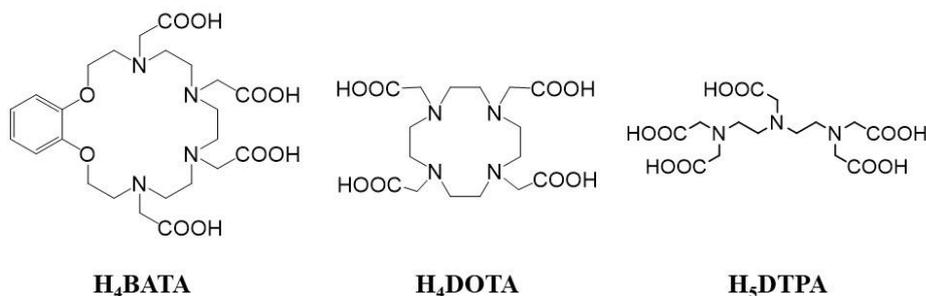


Рисунок 6. Структурные формулы лигандов H₄BATA, H₄DOTA и H₅DTPA.

Лиганд H₄BATA был синтезирован в ИНЭОС РАН в лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем, рук. д.х.н., проф. Фёдорова О.А. Лиганды H₄DOTA ($\geq 97,0\%$) и H₅DTPA ($\geq 98,0\%$) были приобретены у Sigma-Aldrich (США).

Содержание лантана в эксперименте по экстракции измеряли с помощью ИСП-МС (PlasmaQuant MS Elite). УФ-спектры были получены на двухлучевом спектрофотометре UV-1900i Shimadzu. Измерение радиоактивности проводилось с помощью гамма-спектрометра ORTEC DSPec50 (16013585) с коаксиальным детектором из чистого германия GEM-C5060P4-B (56-TP23840B) и GR3818 Canberra Ind, а также методом жидкостной сцинтилляционной спектроскопии с помощью спектрометра Perkin Elmer Tri-Carb 2810 TR. Визуализацию веществ в ТСХ осуществляли с помощью цифровой радиографии (Perkin Elmer Cyclone Plus Phosphor Imager) и программного обеспечения OptiQuant, время экспонирования (время воздействия излучения на фотопластинку) выбиралось в зависимости от радиоактивности образцов.

Эмбриональная бычья сыворотка с тройной стерильной фильтрацией по 0,1 мкм была приобретена у фирмы NuClone (Южный Логан, Юта, США). Условия хранения и эксплуатации были соблюдены.

Д2ЭГФК (ди-(2-этилгексил) фосфорная кислота), 95%, приобретен у Acros Organics (США). Раствор толуола (х.ч.) был приобретен в компании «Реахим» (Россия) и в экспериментах по экстракции использовался в качестве растворителя без дополнительной очистки. Азотную кислоту 69% (о.с.ч.) и соляную кислоту 37% (о.с.ч.) приобретали в компании Panreac (Испания), а для приготовления более разбавленного раствора использовали деионизированную воду (MilliQ). Для приготовления буферного раствора использовали

MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, ч.д.а.), которая была приобретена у Fisher Scientific. Сухой гидроксид натрия и нитрат калия (ч.д.а.) были приобретены у Panreac (Германия). Перхлорат натрия, а также хлорид натрия, хлорид калия, гидрофосфат натрия и дигидрофосфат калия для приготовления PBS были приобретены у Acros Organics (ч.д.а.). Гексагидрат нитрата лантана(III) (х.ч.) приобретен у компании Sigma-Aldrich (США). Раствор хлорида висмута готовили из сухого нитрата висмута пентагидрата (х.ч.). Пластины для ТСХ на алюминиевой подложке (целлюлоза, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) использовались для анализа радиохимической чистоты комплексов лиганда с ^{207}Bi и ^{228}Ac . Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) проводилась с использованием системы Waters 600, оснащенной двухволновым детектором поглощения Waters 2487 для мониторинга при 272 и 220 нм и колонкой Symmetry C18, 4,6 мм x 75 мм.

В качестве более удобного для работы радиоизотопа висмута использовали ^{207}Bi фирмы Ритверц. ^{225}Ac был предоставлен ИЯИ РАН (Троицк), рабочий раствор приготовлен в 0,01 М HNO_3 . ^{228}Ac получали перед каждым экспериментом путём элюирования с лабораторного генератора $^{228}\text{Ra}/^{228}\text{Ac}$ на основе смолы DGA [83]. Для этого ^{228}Ra был выделен из ^{232}Th методом экстракции Д2ЭГФК в толуоле согласно методике, представленной в литературе для выделения ^{225}Ra из ториевой мишени [84]. Процедуру начинали с загрузки раствора (5 мл), содержащего ^{228}Ra и ^{228}Ac в 3 М HNO_3 , на колонку со смолой DGA объёмом 1 мл (N,N,N',N'-тетра-н-октилдигликольамид, TrisKem Int), через которую предварительно пропускали H_2O (3 × 5 мл), а затем 3 М HNO_3 (3 × 5 мл). В этих условиях ^{228}Ra элюировался с колонки, в то время как ^{228}Ac сорбировался на смоле DGA. Колонку промывали HNO_3 (3 × 5 мл; 3 М) – получали фракцию, содержащую ^{228}Ra . Затем ^{228}Ac смывали с колонки HNO_3 (3 × 5 мл; 0,01 М) – получали фракцию, содержащую ^{228}Ac . Далее фракцию с ^{228}Ac пропускали через колонку с небольшим количеством смолы prefilter (1 мл; TrisKem Int) для удаления органических примесей. Полученный раствор использовали для экспериментов. Фракцию, содержащую ^{228}Ra , готовили для следующего эксперимента упаривая досуха, затем удаляли органические примеси добавлением концентрированной HNO_3 при нагревании, после чего раствор с ^{228}Ra переводили в 3 М HNO_3 .

Примеси стабильных металлов во фракциях ^{225}Ac и ^{228}Ac определяли с помощью атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС) Optima 2100 DV (PerkinElmer, Inc., США). Концентрация тория (мишенного материала) была ниже 0,1

мг/л. Суммарное содержание устойчивых примесей в растворе ^{225}Ac , как и в описанном выше растворе ^{228}Ac , не превышало 5 ppm с основным вкладом Al, Fe, Cr и Pb.

Таблица 1. Содержание устойчивых примесей в растворах с ^{225}Ac и ^{228}Ac , мг/л.

Элемент	^{225}Ac	^{228}Ac	Элемент	^{225}Ac	^{228}Ac
Al	0.921	0.093	Zn	< 0.1	0.041
Fe	1.312	0.095	Cu	< 0.1	0.071
Pb	0.969	0.129	Ni	< 0.3	0.053
Cr	0.792	0.023	Cd	< 0.1	0.069
Mn	0.344	0.064	Th	< 0.1	-

2.2 Определение констант протонирования лиганда и устойчивости комплексов

Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование осуществлялось с помощью автотитратора Titrand 808 (Metrohm), оснащенного комбинированным стеклянным электродом Hanna Instruments модели HI 1330 и сосудом для титрования с термостатическим стаканом, поддерживающим температуру $25,0 \pm 0,1$ °C. Титрант представлял собой раствор NaOH ч. д. а. с приблизительной концентрацией 0,1 М. Точную концентрацию раствора NaOH определяли методом Грана путём титрования предварительно стандартизированных количеств HCl или HClO₄ и определении точки эквивалентности по методу Грана с использованием программного обеспечения GLEE [85]. Ионное произведение воды составляло $pK_w = 13,78$ при 25,0 °C и ионной силе $0,10 \pm 0,01$ М, которая поддерживалась раствором фонового электролита KNO₃.

Исходный раствор лиганда H₄BATA готовили с концентрацией 0,01 М. Также готовили раствор La(NO₃)₃ с концентрацией 0,1 М. Аналитический раствор с Bi³⁺ готовили путём растворения Bi(NO₃)₃ в 0,7 М растворе HCl для предотвращения гидролиза свободного висмута, конечная концентрация Bi³⁺ составила 0,025 М. Потенциометрическое титрование проводили при концентрации лиганда 1 мМ и эквимолярном количестве катиона Bi³⁺ или La³⁺ в общем объеме 16,00 мл при $25,0 \pm 0,5$ °C. Данные были получены в диапазоне pH 2,0–11,0. Концентрацию протонов [H⁺] в растворах определяли путем измерения электродвижущей силы ячейки, $E = E_0 + Q \lg[H^+] + E_j$. Члены E₀ и Q определяли титрованием раствора с известной концентрацией ионов водорода при той же ионной силе. Каждое титрование состояло из 80–100 точек и повторялось дважды. Константы устойчивости комплексов определяли по полученным данным электродвижущей силы E с

помощью программы Hyperquad [85], а диаграммы распределения форм лиганда и комплекса строили с помощью программы Hyss [86].

Общие константы протонирования и комплексообразования β_{HhL} и β_{MmHhL} определяются соотношениями: $\beta_{\text{HhL}} = [\text{H}_h\text{L}_l] / [\text{H}]^h [\text{L}]^l$ и $\beta_{\text{MmHhL}} = [\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l] / [\text{M}]^m [\text{H}]^h [\text{L}]^l$, а ступенчатые как: $K_{\text{MmHhL}} = [\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l] / [\text{M}_m\text{H}_{h-1}\text{L}_l][\text{H}]$ и соответствуют разнице в логарифмических единицах между общими константами последовательно протонированных (или гидроксо-форм) форм.

Метод конкурентных реакций

Экстракция

Экстракцию комплексов Vi^{3+} проводили раствором ди-2-этилгексил-фосфата (Д2ЭГФК) в толуоле при pH 2,0, 2,5 и 3,0. Для этого добавляли к раствору лиганда различной концентрации растворы радиоактивного $^{207}\text{Vi}\text{Cl}_3$ и стабильного $\text{Vi}(\text{ClO}_4)_3$ с концентрацией 1 мкМ. Ввиду склонности Vi^{3+} к гидролизу и образованию коллоидов, что затрудняет экстракцию несвязанного Vi^{3+} и приводит к неверным результатам, методика была дополнена предварительной ультразвуковой обработкой исходных растворов ^{207}Vi и стабильного $\text{Vi}(\text{ClO}_4)_3$. Для поддержания ионной силы растворов $^{207}\text{Vi}\text{ViBATA}$ и $^{207}\text{Vi}\text{ViDOTA}$ в качестве фонового электролита использовали 0,1 М KNO_3 и 0,1 М NaClO_4 растворы соответственно. Образцы выдерживали при 25 °С для комплекса ViBATA в течение нескольких минут и при 90°С для комплекса ViDOTA в течение 16 часов для достижения химического равновесия, когда содержание комплекса и свободного катиона не меняется. После этого каждый образец добавляли к раствору Д2ЭГФК в толуоле в объёмном соотношении 1:1 и перемешивали в течение 1 часа. При экстракции свободный Vi^{3+} извлекается в органическую фазу, а комплекс с лигандом остается в водной фазе. По окончании перемешивания органическую и водную фазы разделяли центрифугированием. Содержание комплекса для каждой серии растворов определяли путём измерения радиоактивности ^{207}Vi в водной и органической фазе, а также в аликвоте исходного раствора методом гамма-спектроскопии (570 кэВ).

Экстракцию La^{3+} и Ac^{3+} проводили раствором ди-2-этилгексил-фосфата (Д2ЭГФК) в толуоле при pH 4. Для этого добавляли раствор La^{3+} или радиоактивного $^{228}\text{Ac}\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ к раствору лиганда различной концентрации. Для поддержания ионной силы растворов $^{228}\text{Ac}\text{AcBATA}$ и $^{228}\text{Ac}\text{AcDOTA}$ в качестве фоновых электролитов использовали растворы 0,1 М KNO_3 и 0,1 М NaClO_4 соответственно. Для поддержания pH использовали 0,05 М буфер MES (2-этансульфоновая кислота) в случае комплексов с обоими катионами La^{3+} и

As³⁺. Образцы выдерживали при 25 °С для комплексов La³⁺ и As³⁺ с H₄BATA в течение нескольких минут и при 90°С для комплекса As³⁺ с H₄DOTA в течение 16 часов для достижения химического равновесия, когда содержание комплекса и свободного катиона не меняется. После этого каждый образец добавляли к раствору Д2ЭГФК в толуоле в объёмном соотношении 1:1 и перемешивали в течение 1 часа. При экстракции свободный La³⁺ или As³⁺ извлекается в органическую фазу, а комплекс с лигандом остается в водной фазе. По окончании перемешивания органическую и водную фазы разделяли центрифугированием. Дальнейшее удаление свободного La³⁺ из органической фазы проводили путём реэкстракции катиона в водную фазу путём добавления равного объема H₅DTPA с концентрацией 10⁻⁴ М и последующим перемешиванием в течение 1 часа. По завершении перемешивания фазы разделяли центрифугированием. Аликвоты исходного раствора, водную фазу после экстракции Д2ЭГФК в толуоле и водную фазу после реэкстракции La³⁺ раствором H₅DTPA разбавляли до 3 мл 1% HNO₃. Содержание La³⁺ рассчитывали путем измерения количества лантана в каждой фазе для каждой серии растворов при различных концентрациях H₄BATA методом ИСП-МС. Содержание комплекса для каждой серии растворов с As³⁺ определяли путём измерения радиоактивности ²²⁸As в водной и органической фазе, а также в аликвоте исходного раствора методом гамма-спектроскопии (911 кэВ).

Коэффициенты распределения *D* между органической и водной фазой в каждой экспериментальной точке позволяют определить соотношение M:L в комплексе и значение константы устойчивости комплекса.

Коэффициент распределения *D* экстракционной системы выражаем как:

$$D = \frac{\sum[Bi]_{\text{орг}}}{\sum[Bi]_{\text{водн}}} \quad (1)$$

Для Bi³⁺ в водной фазе, материальный баланс можно записать как:

$$[Bi]_{\text{водн}} = [Bi^{3+}] + [Bi(OH)^{2+}] + [Bi(OH)_2^+] + [Bi(OH)_3] + [Bi(OH)_4^-] + [BiL] \quad (2),$$

где L – исследуемый лиганд (H₄DOTA или H₄BATA) в водной фазе.

Константы гидролиза Bi³⁺ представлены как:

$$K_{Bi(OH)_n} = \frac{[Bi(OH)_n]}{[Bi^{3+}][OH]^n} \quad (3)$$

Выражая равновесные концентрации гидроксокомплексов из уравнения для констант гидролиза (3) и подставив в выражение материального баланса (2), получаем:

$$[Bi]_{\text{водн}} = [Bi^{3+}](1 + \sum_{n=1}^4 K_{Bi(OH)_n} [OH]^n) + [BiL_n] \quad (4)$$

Кажущуюся константу устойчивости выражаем как:

$$\beta^{\text{каж}} = \frac{[BiL_n]}{[Bi^{3+}][L]^n} \quad (5)$$

Выражая из уравнения (5) равновесную концентрацию комплекса и подставляя в уравнение (4) получаем:

$$[Bi]_{\text{водн}} = [Bi^{3+}](1 + \sum_{n=1}^4 K_{Bi(OH)_n} [OH]^n) + [Bi^{3+}]\beta^{\text{каж}}[L]^n \quad (6)$$

Имеем:

$$D = \frac{[Bi]_{\text{орг}}}{[Bi]_{\text{водн}}} = \frac{[Bi]_{\text{орг}}}{[Bi^{3+}](1 + \sum_{n=1}^4 K_{Bi(OH)_n} [OH]^n) + [Bi^{3+}]\beta^{\text{каж}}[L]^n} \quad (7)$$

Общую концентрацию лиганда $c(L)$ выражаем как:

$$c(L) = [L](1 + \sum_{m=1}^5 K_{LH_m} [H]^m) + \beta^{\text{каж}}[Bi^{3+}] \quad (8)$$

Выражая равновесную концентрацию лиганда из уравнения (8) получаем:

$$\frac{D_0}{D} = 1 + \frac{\beta^{\text{каж}}c(L)^n}{(1 + \sum_{n=1}^4 K_{Bi(OH)_n} [OH]^n)(1 + \sum_{m=1}^5 K_{LH_m} [H]^m)} \quad (9)$$

Построив данную зависимость в логарифмических координатах $\lg\left(\frac{D_0}{D} - 1\right) = f\{\lg(c(L))\}$ определяем стехиометрию комплекса как тангенс угла наклона линейной зависимости – число молекул лиганда n на один катион. В случае $n=1$ из тангенса угла наклона зависимости $D_0/D-1$ от $c(L)$ получаем кажущуюся константу устойчивости для заданных условий.

Кажущаяся константа устойчивости (константа устойчивости при заданных условиях - рН, температуре, ионной силе) определяется как:

$$\beta^{\text{каж}} = \beta_{101} + \beta_{111}[H^+] + \dots \quad (11)$$

Где β_{101} истинная константа устойчивости формы комплекса $[BiL]$, а последующие β – константы устойчивости протонированных форм комплекса.

Сорбция

Для построения кривой комплексообразования As^{3+} с H_4BATA в зависимости от рН проводили сорбцию комплексов As^{3+} при рН 6 и 7 на целлюлозе (10 мг). Для этого были приготовлены растворы радиоактивного $[^{228}As]As(NO_3)_3$ при заданных рН и концентрации

H_4BATA 5 мкМ. Для поддержания ионной силы раствора использовали 0,067 М раствор NaClO_4 . Для поддержания pH использовали 0,05 М буфер MES (2-этансульфоновая кислота). Сорбция осуществлялась при комнатной температуре в течение 4 ч. После этого сорбент осаждали путём центрифугирования и отделяли раствор над осадком. Содержание комплекса для каждого раствора определяли путём измерения радиоактивности ^{228}Ac в аликвоте раствора после сорбции и в исходном растворе методом гамма-спектроскопии (911 кэВ).

2.3 Определение структуры комплексов

Квантово-химический расчёт

В случае комплексов с лигандом H_4BATA не удалось получить монокристаллы комплексов. Поэтому моделирование структуры комплексных соединений Bi^{3+} , La^{3+} и Ac^{3+} проводилось путём её оптимизации в программе ORCA методом теории функционала плотности (DFT).

В случае комплексов $[\text{BiBATA}]^-$ и $[\text{LaBATA}]^-$ моделирование проводили с использованием гибридного функционала PBE0 [87] и поправкой на дисперсию D4 [88]. Первичную оптимизацию структуры комплексов проводили используя валентный двойной дзета-базис def2-SVP [89], затем тройной дзета-базис def2-TZVP [90], и для $[\text{LaBATA}]^-$ финальную геометрию получали используя def2 базис, дополненный диффузными функциями s и p: ma-def2-TZVP [89]. В расчёте также использовали вспомогательный базис def2/J [91] и учитывали влияние растворителя (воды) с помощью CPCM модуля.

При моделировании структуры комплекса $[\text{AcBATA}]^-$ использовали гибридный функционал PBE0 [92] с поправкой на дисперсию D4 [88]. В расчёте также применяли релятивистскую аппроксимацию DKH [93, 94]. Атомные орбитали описывали при помощи двойного дзета-базиса DKH-def2-SVP [95], а для актиния отдельно при помощи базиса SARC-DKH-TZVP [96]. В расчёте также использовали автоматическую генерацию вспомогательных базисных наборов [97] и учитывали влияние растворителя (воды) с помощью CPCM модуля.

Спектроскопия протяжённой тонкой структуры рентгеновского поглощения (EXAFS)

Измерения рентгеновского поглощения для L_3 края Bi^{3+} в форме водного раствора с лигандом H_4BATA проводились на станции структурного материаловедения [98] 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 Si (111) монокристалла в качестве монохроматора. Калибровка по энергии проводилась с использованием спектра металлического висмута, с энергией L_3 края поглощения 13419 эВ. Данные EXAFS ($\chi_{\text{exp}}(k)$) были проанализированы с использованием пакета анализа данных IFEFFIT [99]. При обработке данных EXAFS использовались стандартные процедуры вычитания фона.

2.4 Определение радиохимической чистоты комплексов Bi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA

Растворы комплексов лиганда H_4BATA с Bi^{3+} или Ac^{3+} готовили в 500 мкл в пластиковой пробирке Eppendorf путём добавления к раствору лиганда заданной концентрации в 0,01 М буфере MES раствора $^{207}\text{Bi}[\text{BiCl}_3]$ (0,5-3 кБк) или $^{228}\text{Ac}[\text{Ac}(\text{NO}_3)_3]$ (порядка 0,2-0,5 кБк). Ход реакции радиоактивного мечения отслеживали используя метод ТСХ. Для этого была подобрана система анализа с использованием пластин с целлюлозой на алюминиевой подложке в качестве неподвижной фазы и смеси 0,9% NaCl с 10 мМ NaOH в качестве элюента. Раствор, содержащий радиоактивно меченный комплекс, наносили на стартовую линию пластины и погружали в раствор с элюентом так, чтобы нанесённый комплекс не погружался в раствор элюента. По окончании элюирования пластины разрезались на две части, и измерялась радиоактивность каждой части: в случае комплекса с ^{207}Bi – методом гамма-спектрометрии (по линии $E_\gamma = 570$ кэВ), в случае комплекса $^{228}\text{Ac}[\text{AcBATA}]^-$ - методом гамма-спектрометрии (по линии $E_\gamma = 911$ кэВ) и в случае комплекса $^{228}\text{Ac}[\text{AcDOTA}]^-$ - методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии. Методику ТСХ проверяли методом ВЭЖХ с комплексами LaBATA и AcBATA , элюент А: H_2O , Б: CH_3CN , 0–4 мин: 99–60 % А, 4–10 мин: 60–10 % А, 10–15 мин: 10–99 % А. По пику выхода $[\text{LaBATA}]^-$ (Рисунок П1) было установлено время удерживания комплекса $^{228}\text{Ac}[\text{AcBATA}]^-$ ($t_R = 5,5$ мин), и при анализе образца $^{228}\text{Ac}[\text{AcBATA}]^-$ (Рисунок П2) измеряли радиоактивность фракций с колонки (объёмом 1 мл) и определяли радиохимическую чистоту комплекса. Доля комплекса, полученная методами ТСХ и ВЭЖХ, не отличалась в пределах погрешности, поэтому в дальнейшем для определения радиохимической чистоты комплексов использовали только метод ТСХ ввиду его удобства.

2.5 Спектроскопия в УФ-диапазоне

Кинетику комплексообразования Bi^{3+} с H_4BATA , H_4DOTA и H_5DTPA исследовали методом УФ-спектроскопии в 0,1 М HCl и при $I = 0,6$ М (H,K)Cl для предотвращения гидролиза свободного Bi^{3+} используя пик BiCl_4 (322 нм) (Рисунок П3). Эксперименты проводили в условиях реакции псевдопервого порядка в избытке лиганда: десятикратный избыток лиганда (0,8 мМ) добавляли к раствору Bi^{3+} (80 мкМ) в 0,1 М HCl.

Кинетику диссоциации комплекса Vi^{3+} с H_4BATA , H_4DOTA и H_5DTPA исследовали методом УФ-спектроскопии при $I = 0,6 \text{ M}$ $(\text{H,K})\text{Cl}$. В случае комплекса с H_4BATA за реакцией следили по увеличению пика ViCl_4 (322 нм), поскольку пики лиганда и комплекса $[\text{ViBATA}]^-$ в спектре плохо различимы. В случае комплексов с H_4DOTA и H_5DTPA для удобства использовали пики комплексов с Vi^{3+} (305 и 272 нм соответственно). Растворы комплексов готовили в соотношении $\text{Vi} : \text{L} = 1:1$ при нейтральном pH и проверяли полноту комплексообразования с помощью УФ-спектроскопии. Раствор комплекса добавляли к среде заданной кислотности с конечной концентрацией комплекса 64 мкМ. Все эксперименты проводились при большом избытке H^+ , что обеспечивало условия реакции псевдопервого порядка.

2.6 Стабильность *in vitro*

Связывание с биологически значимыми катионами Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и стабильность в изотоническом растворе

Раствор комплекса с концентрацией 0,5 мМ в 0,01 М буфере MES при pH 6,1 был приготовлен при комнатной температуре (радиохимическая чистота составила 97%). Определяли кинетическую стабильность в изотоническом растворе, а также в среде с большим избытком катионов Ca^{2+} (5 мМ), Mg^{2+} (5 мМ), Zn^{2+} (0,1 мМ) и отдельно Cu^{2+} (0,1 мМ). Через 0, 15, 30, 60, 120 мин и 1 сут из каждого образца отбирали аликвоту для анализа методом тонкослойной хроматографии (ТСХ); элюирование проводили раствором 0,9% NaCl с 10 мМ NaOH на целлюлозных пластинах с алюминиевой подложкой. В этих условиях комплекс Vi^{3+} с H_4BATA поднимается вместе с растворителем вверх ($R_f = 0,9 \pm 0,1$), а несвязанный ^{207}Vi остается на стартовой линии ($R_f \sim 0$). В случае конкурентного связывания скорость счета на стартовой линии увеличивается. Процент комплекса рассчитывали путем деления скорости счёта верхней половины хроматографической пластины на их сумму с нижней половиной.

Связывание с La^{3+}

Был приготовлен исходный 0,1 М водный раствор $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ (0,1 М). К образцу, содержащему H_4BATA (500 мкл 50 мкМ; $2,5 \times 10^{-8}$ моль) и ^{228}Ac (3 кБк) в 0,01 М буфере MES при pH 6,0, добавляли 50-кратный избыток La^{3+} (12,5 мкл 0,01 М; 2,5 мМ в конечном растворе). Раствор хранили при 37°C и определяли содержание комплекса в растворе с помощью ТСХ через 0, 30, 60 мин, 16 ч и 1 сут. Элюирование проводили раствором 0,9% NaCl с 10 мМ NaOH на целлюлозных пластинах с алюминиевой подложкой. В этих условиях комплекс поднимается вместе с растворителем вверх ($R_f = 0,9 \pm 0,1$), а

несвязанный ^{228}Ac остается на стартовой линии ($R_f \sim 0$). В случае конкурентного связывания скорость счета на стартовой линии увеличивается. Оставшийся процент комплекса рассчитывали путем деления скорости счёт верхней половины хроматографической пластины на их сумму с нижней половиной.

Стабильность в эмбриональной бычьей сыворотке

Оценку стабильности комплекса H_4BATA с Bi^{3+} проводили в 100-кратном избытке сыворотки, а комплексов с Ac^{3+} - в 10-кратном избытке по объёму. Объём сыворотки крови в обоих случаях составлял 1 мл. Растворы с Bi^{3+} были приготовлены с концентрацией лиганда 500 мкМ, а с Ac^{3+} - 50 мкМ в объёме 500 мкл 0,01 М буфере MES, pH $6,0 \pm 0,1$. Через заданные временные интервалы отбирали аликвоту раствора (100 мкл) и осаждали сывороточные белки путём добавления этанола (300 мкл). Раствор охлаждали и центрифугировали (14000 об/мин, 5 мин) для отделения маточного раствора над осадком. Затем определяли радиоактивность маточного раствора по отношению к исходному методом гамма-спектрометрии и определяли, как меняется содержание радиоактивного комплекса с течением времени в сыворотке крови [100].

2.7 Биораспределение в организме мышей

Эксперимент по биораспределению оценивали на нормальных самцах мышей линии C57bl/6. Все эксперименты проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС для экспериментов на лабораторных животных и одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Для экспериментов *in vivo* использовали по 3 нормальных самцов мышей линии C57bl/6 на каждую временную точку. Мышей содержали с 12-часовыми циклами свет/темнота с доступом к воде и пище вволю. Для приготовления $^{207}\text{Bi}] \text{BiBATA}$ растворы, содержащие $^{207}\text{Bi}^{3+}$ в 0,01 М MES при pH 6,3, разбавляли стерильным изотоническим раствором с итоговой радиоактивностью 2,0–2,5 кБк в 100 мкл. Для приготовления $^{225}\text{Ac}] \text{AcBATA}$ и $^{225}\text{Ac}] \text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ растворы, содержащие ^{225}Ac в 0,01 М буфере MES при pH 6,3, разбавляли стерильным изотоническим раствором с итоговой радиоактивностью 0,8 и 1,2 кБк в 100 мкл для $^{225}\text{Ac}] \text{AcBATA}$ и $^{225}\text{Ac}] \text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ соответственно. Радиохимическая чистота раствора $^{207}\text{Bi}] \text{BiBATA}$ и $^{225}\text{Ac}] \text{AcBATA}$, содержащего 1 мМ лиганда H_4BATA , была определена с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и путём проверки связывания с сывороткой крови и достигала 97 и 99 % соответственно. Все растворы готовили при комнатной температуре. Инъекции объёмом 100 мкл вводили путём внутрибрюшинной инъекции в случае висмута и внутривенной инъекции через хвостовую вену в случае актиния. Вес мышей составлял 28–37 в случае висмута и 17,6–27,4 в случае

актиния. Также из каждого исходного раствора брали аликвоты, которые служили внешними стандартами для определения радиоактивности. Мышей подвергали эвтаназии спустя 1 и 6 ч в случае висмута и спустя 6 ч в случае актиния путем смещения шейных позвонков. Кровь забирали сразу после эвтаназии и смешивали со 100 мкл раствора гепарина. Извлекали основные органы, кровь и перитонеальную жидкость промывали 0,9% раствором NaCl, затем органы взвешивали во влажном состоянии и измеряли радиоактивность каждого с помощью γ -сцинтилляционного счетчика непосредственно после изъятия органов в случае висмута и через 5 ч после эвтаназии в случае актиния для достижения радиоактивного равновесия ^{225}Ac с дочерним радионуклидом ^{213}Bi . Для каждой ткани рассчитывали процент вводимой дозы на грамм (% вв.д./г), и представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Определение констант протонирования лиганда

Константы протонирования лиганда H_4BATA определяли при $25^\circ C$ в $0,1 M$ водном растворе KNO_3 методом потенциометрического титрования. Полученная кривая титрования представлена на Рисунок П4. Чаще всего определение константы проводят в $0,1 M$ растворе электролита из-за ряда факторов. Во-первых, этой концентрации достаточно для поддержания стабильного значения ионной силы. Во-вторых, в случае необходимости полученное значение константы может быть пересчитано на $I = 0$ с использованием расширенного уравнения Дебая-Хюккеля: методом SIT (учитывает коэффициенты взаимодействия между различными ионами в расчёте коэффициентов активности) или уравнением Дэвиса (эмпирическое уравнение, при $I = 0,1 M$ рассчитанные значения коэффициентов активности практически не отличаются от измеряемых), которые не используют при $I > 0,1 M$ [101]. Расчёт константы устойчивости на условия $I = 0$ необходим в случае сравнения полученных констант с представленными в литературе, которые были получены при других значениях ионной силы. В-третьих, $0,1 M$ значение ионной силы близко к значению ионной силы в изотонических растворах (например, $0,9\%$ раствор $NaCl$ характеризуется $I = 0,15 M$), а значит, лучше моделирует устойчивость в организме. Рассчитанные константы протонирования лиганда H_4BATA , а также представленные в литературе константы протонирования лиганда H_4DOTA , который на практике чаще всего используется в качестве хелатирующего агента в таргетных РФЛП, представлены в Таблица 2.

Таблица 2. Значения ступенчатых констант протонирования лигандов H_4BATA и H_4DOTA .

	H_4BATA	H_4DOTA
	lgK_{HhL}	lgK_{Hh} [102]
HL	$11,9 \pm 0,2$	$11,08 \pm 0,07$
H_2L	$10,0 \pm 0,1$	$9,23 \pm 0,02$
H_3L	$8,4 \pm 0,2$	$4,24 \pm 0,02$
H_4L	$5,2 \pm 0,3$	$4,18 \pm 0,03$
H_5L	$2,6 \pm 0,4$	$1,88 \pm 0,06$
H_6L	–	$1,71 \pm 0,07$

В силу более основных свойств, протонирование ациклических полиаминокарбоксилатов (например, H_5DTPA) происходит путем протонирования атомов азота аминогрупп с последующим протонированием карбоксильных групп [103]. В то же

время, схема протонирования H_4DOTA отличается от схемы протонирования его нециклического аналога - H_4TTNA . Это отличие состоит в том, что два атома азота макроцикла H_4DOTA оказываются менее основными, чем кислороды карбоксильных групп [102], и обусловлено это стерическим затруднением протонирования соседних аминогрупп в пределах небольшого макроцикла 12-краун-4. Сравнение констант протонирования H_4BATA и H_4DOTA показывает, что все четыре аминогруппы H_4BATA более основные, чем аминогруппы H_4DOTA . Таким образом, последовательное протонирование H_4BATA ближе к схеме протонирования нециклического аналога H_4TTNA , чем к H_4DOTA , что, по-видимому, обусловлено большой макроциклической полостью H_4BATA , которая обеспечивает большую подвижность молекулы, что облегчает протонирование соседних аминогрупп по сравнению с H_4DOTA , структура которой достаточно жёсткая. Помимо H_4TTNA [103], полученные значения ступенчатых констант протонирования H_4BATA близки к значениям для других полиаминокарбоксилатов, таких как H_4TETA , H_5PEPA и H_6HENA с большим размером макроцикла [104]. Значение $lgK_{H_5L} = 2,6$ лиганда H_4BATA соответствует протонированию одной из четырех карбоксильных групп подобно протонированию $-COOH$ группы молекул H_4EDTA , H_5DTPA и других аминов. Полученное распределение протонированных форм лиганда H_4BATA в зависимости от значений pH представлено на Рисунок 7. В условиях потенциометрического титрования трудно достоверно оценить образование дальнейших протонированных форм при более низких значениях pH.

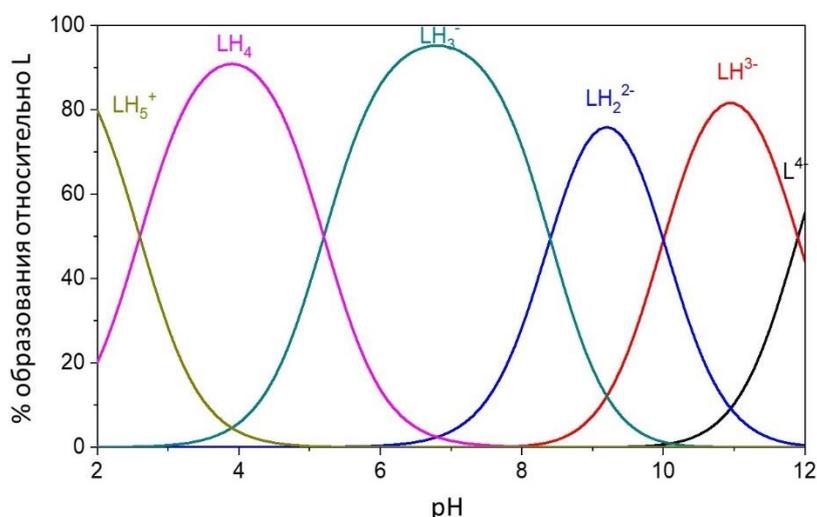


Рисунок 7. Диаграмма распределения форм лиганда H_4BATA в зависимости от pH.

3.2 Исследование термодинамической устойчивости комплексов Bi^{3+} , La^{3+} и Ac^{3+} с лигандами H_4DOTA и H_4BATA

Константы устойчивости комплексов La^{3+} , Ac^{3+} с H_4DOTA и H_4BATA

Как уже упоминалось в обзоре литературы, стандартный метод потенциометрического титрования для определения константы устойчивости комплекса требует, как минимум, миллимолярных концентраций и неприменим для комплексов с Ac^{3+} . В этом случае обычно вместо Ac^{3+} проводят титрование La^{3+} для оценки константы устойчивости из-за химического сходства этих катионов [105]. Полученные значения констант устойчивости форм комплекса La^{3+} с H_4BATA представлены в Таблица 3. Ac^{3+} - первый элемент в ряду актиноидов и занимает крайнее положение в периодической таблице, как и его аналог в ряду лантаноидов La^{3+} . Трехвалентные катионы Ac^{3+} и La^{3+} не имеют 5f и 4f валентных электронов соответственно и принимают электронную конфигурацию благородных газов ($[\text{Rn}]$ и $[\text{Xe}]$ соответственно). Также Ac^{3+} и La^{3+} являются самыми крупными трехвалентными катионами в рядах актиноидов и лантаноидов соответственно. Однако, несмотря на их сходство, параметры комплексообразования этих катионов могут отличаться. Поэтому определение константы устойчивости именно для Ac^{3+} представляет особый интерес. Зачастую, для этого используют экстракционную хроматографию с использованием смолы Chelex для определения констант устойчивости или кинетических параметров реакций [72, 73, 106]. Но тот же принцип можно использовать в экстракции и сорбции. Следовательно, для определения констант устойчивости комплексов $[\text{AcBATA}]^-$ и $[\text{AcDOTA}]^-$ в микромолярных концентрациях лигандов был использован метод конкурентных реакций: экстракция, как в случае с Bi^{3+} , при $\text{pH} \leq 5$, и сорбция при $\text{pH} > 5$. Свободный Ac^{3+} и связанный в комплекс с лигандом распределяется между органической и водной фракциями или хроматографической целлюлозой и водным раствором.

Ввиду сложности определения константы устойчивости напрямую с Ac^{3+} , в литературе представлено небольшое количество различных констант устойчивости его комплексов [107], и известен лишь один случай определения константы устойчивости комплексов циклической полиаминокарбоновой кислоты с Ac^{3+} напрямую: для комплекса $[\text{AcDOTA}]^-$ методом ТСХ [71]. Для выбора pH, при котором необходимо проводить эксперимент, сначала проводили серию экспериментов по комплексообразованию в избытке лиганда в диапазоне pH от 2 до 7. В соответствии с экспериментами с комплексом $[\text{AcDOTA}]^-$, для $[\text{AcBATA}]^-$ провели аналогичную серию экспериментов. Для обеспечения максимального

комплексообразования готовили растворы с концентрацией лиганда 5 мкМ, при которой в нейтральном рН доля комплекса в растворе близка к 100%. Результат исследования зависимости комплексообразования от рН представлен на Рисунок 8.

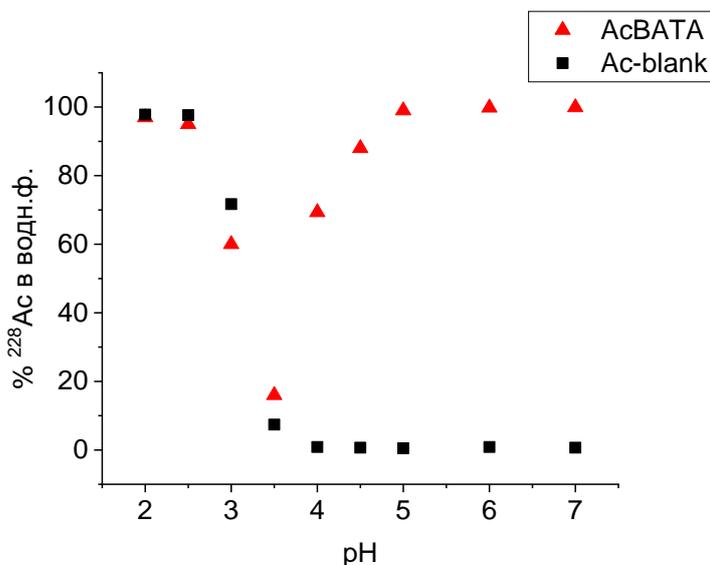


Рисунок 8. Содержание Ac^{3+} в водной фазе в зависимости от рН при 25°C ($c_L = 5 \text{ мкМ}$) без добавления лиганда и в присутствии H_4BATA после экстракции или сорбции.

Из полученной зависимости (Рисунок 8) видно, что для количественного связывания Ac^{3+} с H_4BATA требуется $\text{pH} > 5$. С другой стороны, для корректного определения константы устойчивости эксперимент должен быть проведён так, чтобы в растворе в измеримых количествах присутствовали как свободные формы Ac^{3+} , так и его комплекс с H_4BATA . В случае полного комплексообразования нельзя надёжно обработать данные, что приводит к занижению значения константы устойчивости [72]. Следовательно, согласно Рисунок 8, для изучения равновесия между свободным Ac^{3+} и его комплексом с H_4BATA подходит диапазон рН от 3 до 5. Для определения константы устойчивости комплекса варьировали содержание лиганда в ряду водных растворов при фиксированном значении рН = 4. Такой же рН был взят для определения константы устойчивости комплекса Ac^{3+} с H_4DOTA исходя из данных, представленных в литературе, по определению константы устойчивости формы $[\text{AcDOTA}]^-$ методом ТСХ [71]. Растворы, содержащие Ac^{3+} и лиганд H_4DOTA , выдерживали при 90°C в течение 16 ч для достижения равновесия (Рисунок П5). Растворы с Ac^{3+} и лигандом H_4BATA готовили при 25°C из-за высокой скорости комплексообразования (и, следовательно, достижения равновесия) с H_4BATA .

Для сравнения, сначала определяли константу устойчивости комплекса La^{3+} с лигандом H_4BATA . Как уже упоминалось, La^{3+} - подходящий нерадиоактивный заместитель Ac^{3+} , и

его обычно используют в работах, где невозможно провести эксперимент с As^{3+} [62, 105, 108, 109]. Следовательно, мы определили константу устойчивости $[\text{LaBATA}]^-$, используя как метод экстракции, так и стандартный метод потенциометрического титрования для подтверждения методики конкурирующих реакций. Жидкостную экстракцию проводили при pH 4 по той же методике, что и затем для комплекса H_4BATA с As^{3+} . Концентрацию La^{3+} в органической фазе, водной фазе и аликвоте исходного образца определяли методом ИСП-МС. Коэффициенты распределения La^{3+} при различных концентрациях H_4BATA в водной фазе использовали для определения стехиометрии комплекса и константы устойчивости. Зависимость логарифмов $D_0/D-1$ и $c(L)$ указывает на стехиометрию комплекса 1:1 для $[\text{LaBATA}]^-$ (Рисунок 9а). Для расчета константы устойчивости комплекса $[\text{LaBATA}]^-$ использовали наклон зависимости $D_0/D-1$ от концентрации лиганда (Рисунок 9б).

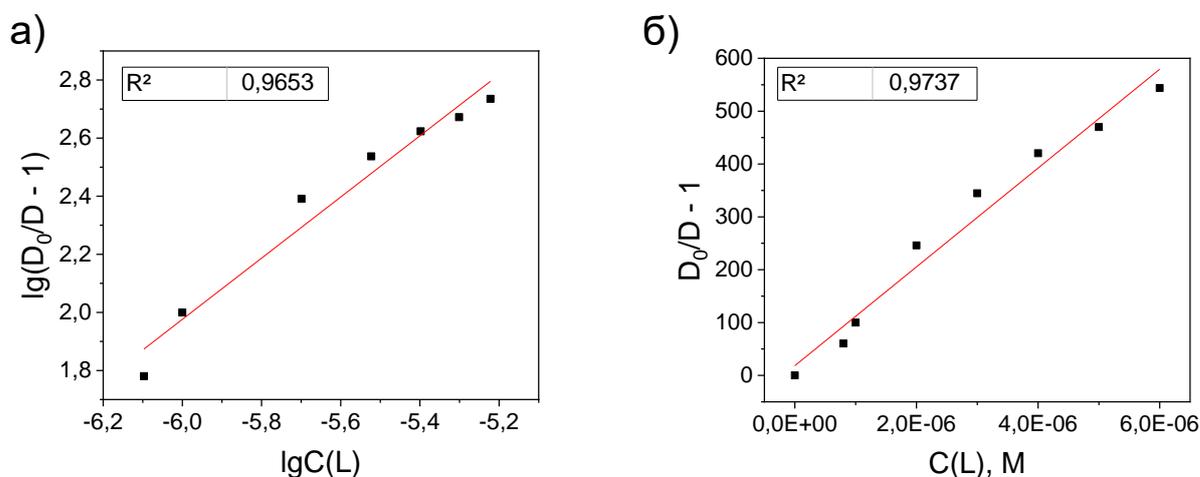


Рисунок 9. а) Зависимость логарифмов соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 4 комплекса La^{3+} с H_4BATA . б) Зависимость соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 4 комплекса La^{3+} с H_4BATA .

Полученное значение константы $\lg K = 27,5 \pm 0,3$ хорошо согласуется со значением константы, полученным потенциометрическим титрованием, $\lg K = 27,0 \pm 0,3$ (Таблица 3). Следовательно, данная методика экстракции позволяет достаточно надежно определять константы устойчивости с As^{3+} .

Таблица 3. Константы устойчивости ($\lg K$) и pAc комплексов $[AcDOTA]^-$ и $[AcBATA]^-$, полученных методом экстракции и константы устойчивости ($\lg K$) и pLa комплексов La^{3+} с H_4DOTA и H_4BATA , полученных методом потенциометрического титрования.

	H₄DOTA	H₄BATA^a
$Ac^{3+} + L^{4-} = [AcL]^-$	$20,4 \pm 0,3^{\delta}$	$26,0 \pm 0,3$
pAc	16,3	18,8
$La^{3+} + L^{4-} = [LaL]^-$	$22,9^{\epsilon}$	$27,0 \pm 0,2$
$LaL^- + H^+ = [LaHL]$	-	$2,7 \pm 0,2$
$[La(OH)L]^{2-} + H^+ = [LaL]^- + H_2O$	-	$10,5 \pm 0,3$
pLa	16,0	19,9

^a 0,1 М KNO₃ при 25°C; ^б 0,1 М NaClO₄ при 90°C; ^ε 0,1 М KCl при 25°C [110].

Коэффициенты распределения Ac^{3+} при варьировании концентрации лиганда в водной фазе позволяют определить стехиометрию комплекса и константу устойчивости полученного комплекса. Таким образом, зависимость логарифмов $D_0/D-1$ и $c(L)$ позволяет сделать вывод о стехиометрии 1:1 комплекса $[AcDOTA]^-$ (Рисунок 10а) и $[AcBATA]^-$ (Рисунок 11а). Из зависимостей $D_0/D-1$ от концентрации лиганда $c(L)$ (Рисунок 10б и Рисунок 11б) определяли константы устойчивости форм комплексов $[AcDOTA]^-$ и $[AcBATA]^-$.

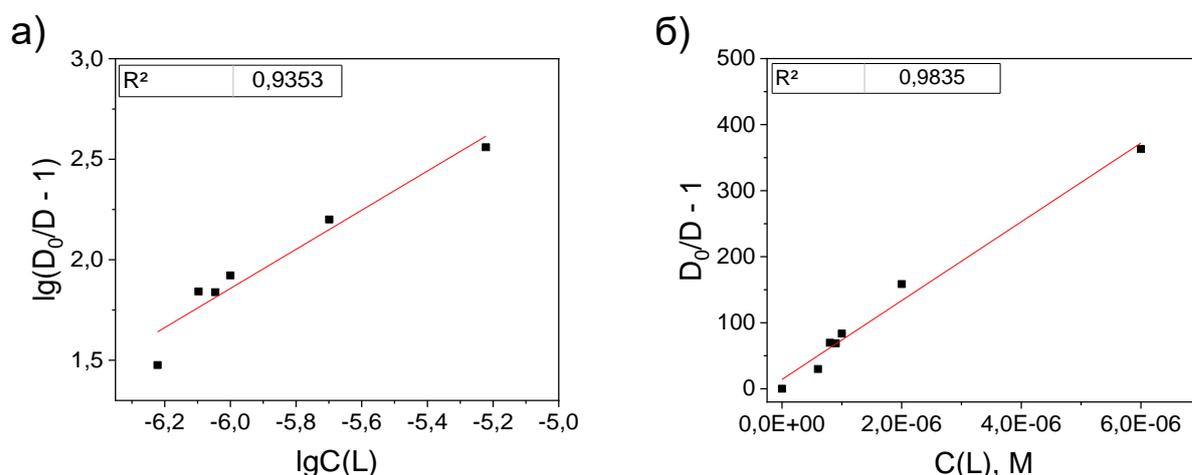


Рисунок 10. а) Зависимость логарифмов соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 4 комплекса Ac^{3+} с H_4DOTA . б) Зависимость соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 4 комплекса Ac^{3+} с H_4DOTA .

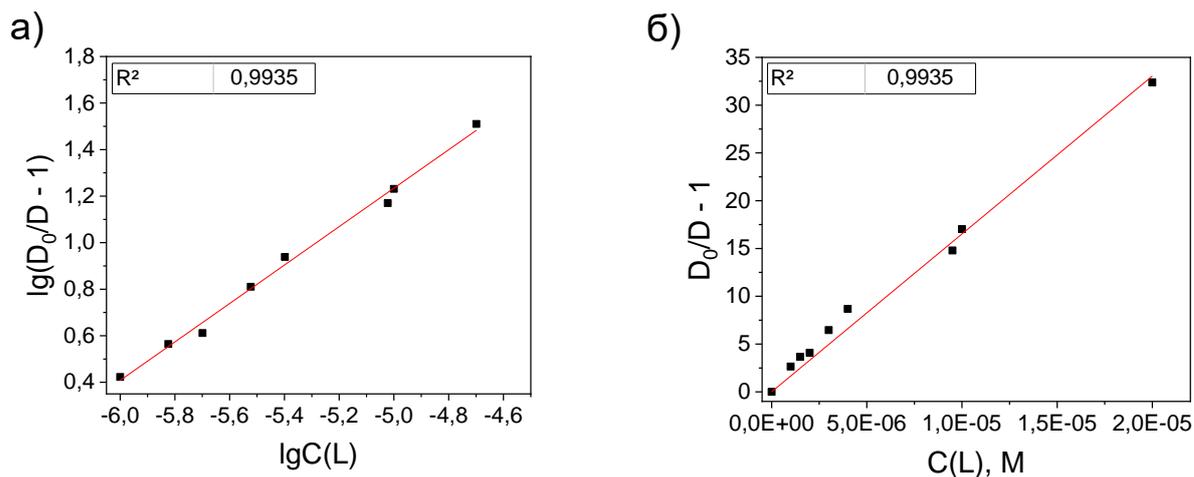


Рисунок 11. а) Зависимость логарифмов соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при рН 4 комплекса Ac^{3+} с H_4BATA . б) Зависимость соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при рН 4 комплекса Ac^{3+} с H_4BATA .

Для расчета констант устойчивости использовали первую константу гидролиза Ac^{3+} [111] и константы гидролиза La^{3+} [112], а также полученные константы протонирования H_4BATA (Таблица 2). В случае H_4DOTA в литературе представлены различные наборы констант протонирования [70 - 72], что обусловлено влиянием катионов щелочных металлов фоновых электролитов (в частности, с Na^+). Известно, что лиганд H_4DOTA образует устойчивые комплексы с Na^+ , что приводит к аномально низким значениям первой и второй константы протонирования в растворах, содержащих Na^+ [72, 78]. Таким образом, рассчитанная согласно полученным экспериментальным данным константа устойчивости формы $[\text{AcDOTA}]^-$ была скорректирована на величину $\lg(1 + K_{\text{NaDOTA}}[\text{Na}^+])$ из-за использования соли NaClO_4 в качестве фонового электролита [72]. Для расчёта использовали константы протонирования H_4DOTA (0,1 М NaClO_4 при 90°C): pK_{a1} $8,52 \pm 0,07$; pK_{a2} $8,43 \pm 0,08$; pK_{a3} $4,39 \pm 0,06$; pK_{a4} $3,83 \pm 0,05$ [71]. Полученные константы устойчивости $[\text{AcDOTA}]^-$ и $[\text{AcBATA}]^-$ представлены в Таблица 3.

Константа устойчивости $[\text{AcDOTA}]^-$, полученная методом экстракции, хорошо согласуется с константой, полученной авторами [71] методом ТСХ ($\lg K_{\text{AcDOTA}} = 19,7$), оказываясь закономерно меньше значения константы комплекса с La^{3+} , полученной методом потенциометрического титрования (Таблица 3). Уменьшение значения константы устойчивости комплекса с увеличением ионного радиуса катиона в ряду лантаноидов характерно для производных H_4DOTA [113]. Ac^{3+} обладает бóльшим ионным радиусом, по

сравнению с La^{3+} , но остаётся химически на него похожим, что укладывается в эту зависимость. Значение константы устойчивости $[\text{AcBATA}]^-$ оказывается выше значения константы устойчивости $[\text{AcDOTA}]^-$, что свидетельствует о более высоком сродстве Ac^{3+} к H_4BATA , чем к H_4DOTA . Кроме того, константа устойчивости $[\text{AcBATA}]^-$, полученная методом экстракции, коррелирует с константой устойчивости $[\text{LaBATA}]^-$, полученной методом потенциометрического титрования, что дополнительно указывает на точность и применимость метода экстракции для определения константы устойчивости.

Для корректного сравнения комплексообразующей способности различных лигандов по отношению к заданному катиону обычно используют величину pM ($pM = -\lg[M^{m+}]_{\text{своб}}$), которая нивелирует фактор различной основности лигандов. Она даёт конкретную информацию о количестве несвязанного катиона при данном pH в присутствии данного лиганда, и, соответственно, позволяет сравнить комплексы различных лигандов между собой. Значения pAc , pLa и далее pBi , для комплексов с лигандами были рассчитаны при pH 7,4 с использованием уравнения 12 и соответствующих значений констант устойчивости и констант протонирования в избытке лиганда: $[M^{3+}]_{\text{общ}} = 1,0 \text{ мкМ}$ и $[L]_{\text{общ}} = 9,0 \text{ мкМ}$.

$$pM = -\lg[M] = -\lg \frac{c(M)}{(1 + \sum_{n=1} K_{M(OH)_n} [OH]^n) + \frac{(K_{ML} + \sum_{i=1} K_{MH_iL} [H]^i + K_{M(OH)L} [OH]) \cdot c(L)}{(1 + \sum_{m=1} K_{LH_m} [H]^m)}} \quad (12)$$

Более высокая термодинамическая устойчивость комплекса Ac^{3+} с H_4BATA находит отражение и в более высоком значении pAc комплекса Ac^{3+} с H_4BATA по сравнению с H_4DOTA . Данный факт позволяет предположить, что более крупная макроциклическая полость лиганда 18-краун-6 (2,6-3,2 Å [53]) H_4BATA по сравнению с 12-краун-4 (1,2-1,5 Å [114]) H_4DOTA оказывается предпочтительнее для Ac^{3+} .

В настоящее время для связывания Ac^{3+} исследуются различные новые лиганды как альтернатива H_4DOTA . Поэтому были рассчитаны значения pM комплексов La^{3+} с другими известными лигандами в тех же условиях для сравнения с термодинамической устойчивостью комплекса $[\text{LaBATA}]^-$. Полученное в работе значение $pLa = 19,9$ для комплекса $[\text{LaBATA}]^-$ оказывается выше, чем комплекса La^{3+} с известным макроциклическим лигандом $\text{H}_2\text{масгора}$ ($pLa = 15,6$ [115]), который рассматривается как наиболее подходящая альтернатива H_4DOTA и на сегодняшний день является самым эффективным лигандом для РФЛП с Ac^{3+} . Значение pLa для $[\text{LaBATA}]^-$ оказывается выше значения для комплекса с другим 18-азакраун-6 тетраацетатом PYTA^{4-} $pLa = 19,6$ в случае комплекса $[\text{LaPYTA}]^-$ [55]. Более того, значение pLa у комплекса $[\text{LaBATA}]^-$ было выше,

чем у комплексов La^{3+} с ациклическими хелаторами, у которых в структуре присутствуют пиколилатные функциональные группы, и которые традиционно характеризуются высокими константами связывания: $\text{H}_2\text{амра}$, $\text{H}_4\text{остара}$ и $\text{H}_4\text{неупра}$ ($pM = 15,1$ [62], $19,7$ [60] и $16,0$ [64] соответственно), уступая лишь $\text{H}_4(\text{py}4\text{ра})$ ($pM = 21,1$ [63]). Эти результаты указывают на высокую термодинамическую устойчивость комплексов $[\text{LaBATA}]^-$ и $[\text{AcBATA}]^-$.

Константы устойчивости комплексов Vi^{3+} с H_4DOTA и H_4BATA

Как правило, для комплексов с Vi^{3+} определение констант устойчивости методом потенциометрического титрования сопряжено с большими трудностями из-за высокой склонности катиона к гидролизу даже при низких значениях pH, что отмечается экспертами ИЮПАК [78]. Дополнительные трудности возникают, если исследуемый лиганд медленно связывает катион. В результате, значения констант устойчивости для комплексов с Vi^{3+} редко можно встретить в литературе. В случае H_4BATA предварительные эксперименты по связыванию Vi^{3+} показали высокую скорость комплексообразования, и было проведено потенциометрическое титрование для определения констант устойчивости. Для этого создавали избыток хлорид-иона, который связывал свободный катион металла в комплекс при $\text{pH} < 2,5$, предотвращая гидролиз. Значения констант устойчивости форм комплекса Vi^{3+} с H_4BATA представлены в Таблица 4. В расчёте констант учитывалось образование гидроксокомплексов и хлоридных комплексов с Vi^{3+} .

Таблица 4. Ступенчатые константы устойчивости и pBi комплексов Bi^{3+} с H_4BATA и H_4DOTA .

	Ступенчатые константы устойчивости (lgK)	
	Экстракция	Спектрофотометрическое титрование
H_4DOTA		
$Bi^{3+} + L = BiL$	$28,5 \pm 0,4$	$30,3 \pm 0,02$ [70]
pBi	$24,4^{[a]}$	$28,0^{[б]}$
H_4BATA	Экстракция	Потенциометрическое титрование
$Bi^{3+} + L = BiL$	$34,4 \pm 0,4$	$31,7 \pm 0,2$
$BiL + H^+ = BiHL$	$3,0 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,2$
$BiHL + H^+ = BiH_2L$	$2,6 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,2$
$BiLOH + H^+ = BiL + H_2O$	-	$9,4 \pm 0,2$
pBi	$27,2$	$24,1$

[а] Используются константы протонирования H_4DOTA , полученные при $90^\circ C$ в $0,1$ М электролите без Na^+ [71]. [б] Используются константы протонирования H_4DOTA , полученные при $25^\circ C$ в 1 М $NaBr$ [70].

* Заряды форм лиганда и комплексов опущены для упрощения.

В исследуемом диапазоне рН были обнаружены протонированные формы комплекса $[H_2BiBATA]^+$, $[HBiBATA]$, а также $[BiBATA]^-$ и $[Bi(OH)BATA]^{2-}$. Диаграмма распределения форм комплекса Bi^{3+} с H_4BATA в зависимости от рН (Рисунок 12) показывает, что в диапазоне рН 5-9 доминирует форма $[BiBATA]^-$. Протонированные формы комплекса образуются при более низких значениях рН, а форма $[Bi(OH)BATA]^{2-}$ - в щелочной среде.

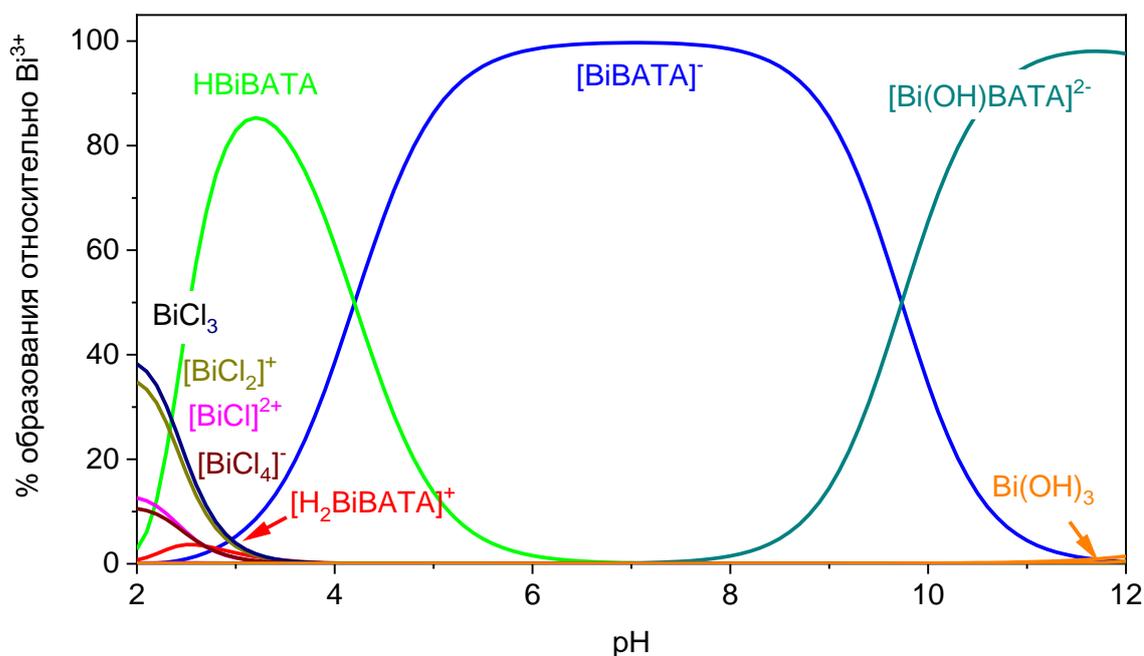


Рисунок 12. Диаграмма распределения форм комплекса Bi^{3+} с H_4BATA в зависимости от pH в условиях потенциометрического титрования ($c_L = c_{\text{Bi}} = 1 \text{ мМ}$).

Полученное значение константы устойчивости формы $[\text{BiBATA}]^-$ оказывается выше значения для $[\text{BiDOTA}]^-$. Из Рисунок 12 можно увидеть, что висмут в форме комплекса с протонированным лигандом представлен при низких значениях pH из-за высоких абсолютных значений констант устойчивости. Можно предположить, что при $\text{pH} < 2$ содержание дипротонированной формы комплекса выше. Тогда его можно определить точнее, и, следовательно значение константы для этой формы тоже.

Данный эффект отмечается исследователями [72] при определении констант устойчивости, связанный с ограничениями рутинно используемого для этой цели метода потенциометрического титрования. Одно из этих ограничений оказывается важным для комплексов, существующих даже при $\text{pH} < 2$, как уже упоминалось ранее обзоре литературы. Альтернативными и более удобными методами определения константы устойчивости в этих случаях могут быть методы конкурентных реакций: экстракция, сорбция, растворимость, тонкослойная хроматография [71, 72, 106].

Для уточнения значений констант Bi^{3+} с H_4BATA , полученных методом потенциометрического титрования, использовали метод жидкостной экстракции Д2ЭГФК. Для сравнения сначала проводили эксперимент по определению константы устойчивости комплекса $[\text{BiDOTA}]^-$. В литературе найдено единственное значение константы устойчивости формы $[\text{BiDOTA}]^-$ в среде с высокой ионной силой 1 М NaBr, полученное

методом спектрофотометрического титрования [70] (Таблица 4). Для определения констант методом жидкостной экстракции были выбраны значения pH 2,0 и 2,5. Образцы нагревали при 90°C, так как при комнатной температуре комплексообразование Bi^{3+} с H_4DOTA происходит медленно. Нагревание проводили в течение 16 часов, поскольку на примере комплексообразования Ac^{3+} с H_4DOTA было показано, что этого времени достаточно для достижения равновесия (рисунок П4).

Логарифмы зависимостей $D_0/D-1$ и $c(L)$ при pH 2 и 2,5 указывают на стехиометрию комплекса $\text{Bi:L} = 1:1$ (Рисунок 13а и Рисунок 14а). Так как эксперименты проводились при $T = 90^\circ\text{C}$, использовали значения констант протонирования H_4DOTA , полученные при 90°C для расчета кажущейся константы устойчивости [71]. Наклон зависимостей $D_0/D-1$ и $c(L)$ при каждом pH (Рисунок 13б и Рисунок 14б) приводит к практически одинаковым константам условной устойчивости: 28,7(4) и 28,4(4) при pH 2,0 и 2,5 соответственно. Этот факт свидетельствует о наличии только формы $[\text{BiDOTA}]^-$ и отсутствии протонированных форм комплекса. Следовательно, полученная кажущаяся константа устойчивости относится именно к $[\text{BiDOTA}]^-$ форме.

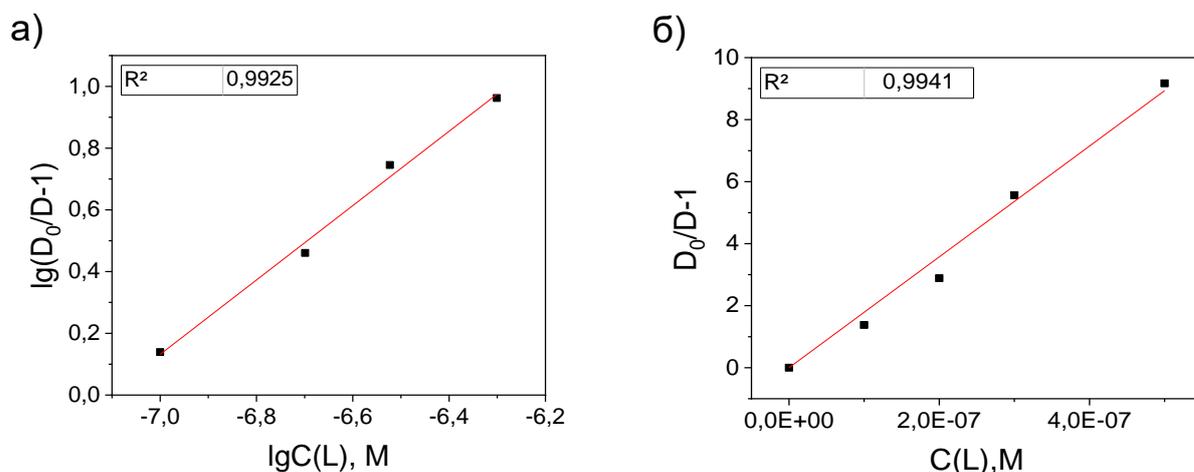


Рисунок 13. а) Зависимость логарифмов соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 2,0 комплекса Bi^{3+} с H_4DOTA . б) Зависимость соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 2,0 комплекса Bi^{3+} с H_4DOTA .

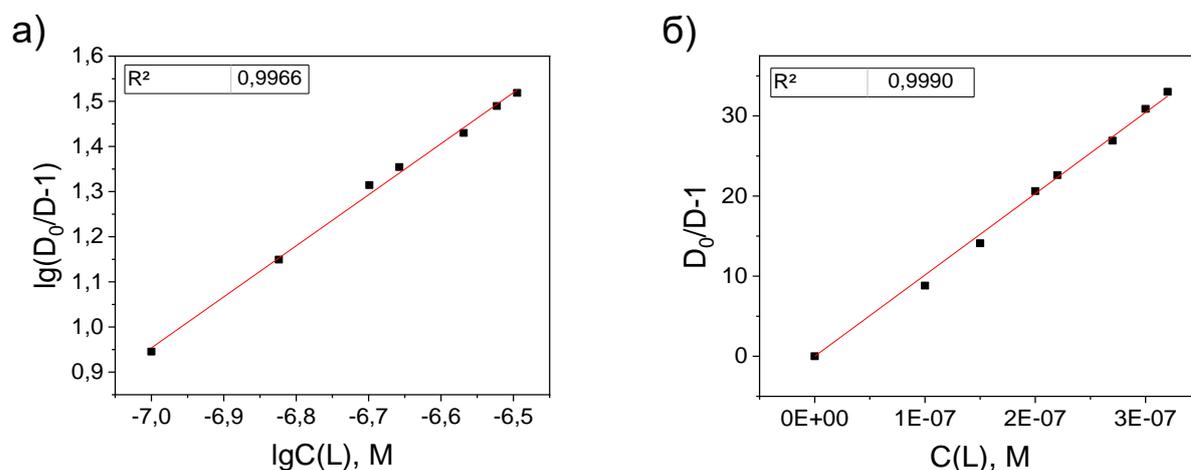


Рисунок 14. а) Зависимость логарифмов соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 2,5 комплекса Bi^{3+} с H_4DOTA . б) Зависимость соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 2,5 комплекса Bi^{3+} с H_4DOTA .

Значение $\lg K = 28,5(4)$ при ионной силе $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$ согласуется с данными спектрофотометрического титрования [70]: $\lg K = 30,3$ при $I = 1 \text{ M NaBr}$. Расхождение констант может быть связано с образованием конкурирующих бромидных комплексов в растворе с такой высокой концентрацией бромидов при спектрофотометрическом титровании, а также с недостаточно точными значениями констант протонирования самого лиганда H_4DOTA при $T = 90^\circ\text{C}$, так как потенциометрическое титрование при такой высокой температуре сопряжено со сложностями практического характера. Также абсолютные значения констант устойчивости весьма высокие, что также вносит дополнительную погрешность. Различие же в значениях pBi для комплекса H_4DOTA с Bi^{3+} , полученных двумя методами, обусловлено разными значениями констант устойчивости, а также константами протонирования H_4DOTA , которые были определены в разных условиях (в $0,1 \text{ M NaClO}_4$ при 90°C в случае экстракции и в 1 M NaBr при 25°C в случае потенциометрического титрования).

Были также предприняты попытки определить кажущуюся константу устойчивости при pH ниже 2, поскольку эксперимент в более кислой среде мог бы позволить еще более точно определить константу устойчивости $[\text{BiDOTA}]^-$ ввиду бóльшего количества свободного катиона. Однако экстракция свободного Bi^{3+} Д2ЭГФК в таких условиях была возможна только при высокой ионной силе (выше 1 M).

Согласно предварительным данным, полученным методом потенциометрического титрования, равновесие между свободным Bi^{3+} и комплексом с H_4BATA существует при pH 2 (Рисунок 12). Следовательно, экстракцию проводили при pH 2,0, 2,5 и 3,0 при $T = 25^\circ\text{C}$.

Как видно из наклона логарифмической зависимости на Рисунок 15а, Рисунок 16а и Рисунок 17а, в диапазоне pH = 2 - 3 наблюдается стехиометрия комплекса 1:1. А наклон зависимостей $D_0/D-1$ от $c(L)$ при каждом pH (Рисунок 15б, Рисунок 16б и Рисунок 17б) позволяет рассчитать логарифмы кажущихся констант устойчивости: 35,9(4), 34,8(4) и 34,2(2) при pH = 2,0, 2,5 и 3,0 соответственно. Экспериментальные данные описываются высоким коэффициентом корреляции, который можно увидеть на каждом графике.

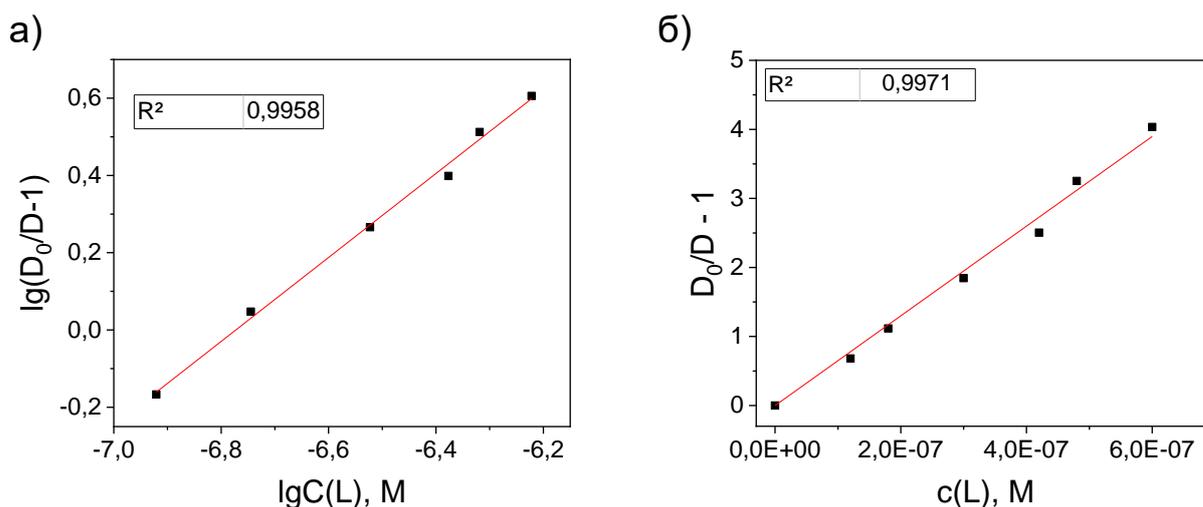


Рисунок 15. а) Зависимость логарифмов соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 2,0 комплекса Bi^{3+} с H_4BATA . б) Зависимость соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при pH 2,0 комплекса Bi^{3+} с H_4BATA .

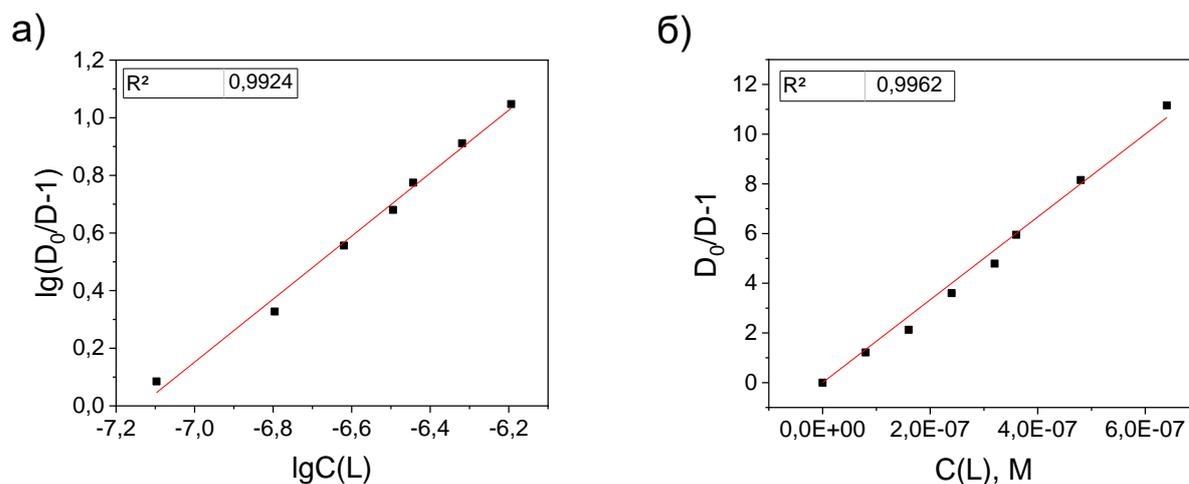


Рисунок 16. а) Зависимость логарифмов соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при рН 2,5 комплекса Bi^{3+} с H_4BATA . б) Зависимость соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при рН 2,5 комплекса Bi^{3+} с H_4BATA .

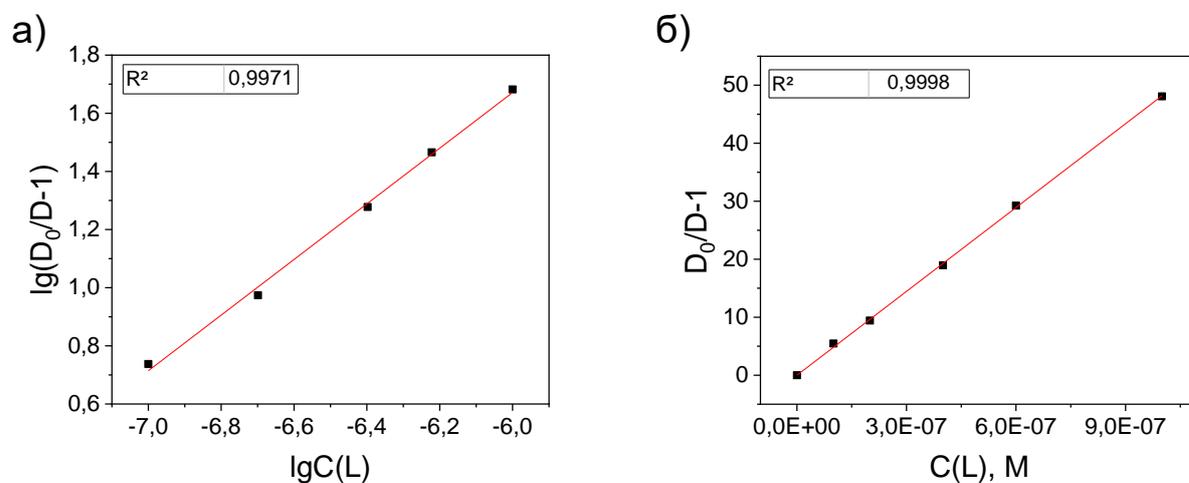


Рисунок 17. а) Зависимость логарифмов соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при рН 3,0 комплекса Bi^{3+} с H_4BATA . б) Зависимость соотношения коэффициентов распределения и концентрации лиганда при рН 3,0 комплекса Bi^{3+} с H_4BATA .

Построив зависимость полученных кажущихся констант устойчивости от $[\text{H}^+]$, описали ее полиномиальной зависимостью второй степени. Для определения константы устойчивости каждой формы комплекса Bi^{3+} с H_4BATA (а именно $[\text{BiBATA}]^-$, $[\text{BiHBATA}]$ и $[\text{BiH}_2\text{BATA}]^+$) решали систему уравнений для каждого рН (2,0, 2,5 и 3,0):

$$\beta^{\text{каж}} = \beta_{101} + \beta_{111}[\text{H}^+] + \beta_{121}[\text{H}^+]^2$$

Где β_{101} – константа устойчивости формы $[\text{BiBATA}]^-$, а β_{111} и β_{121} – константы устойчивости моно- и дипротонированных форм комплекса, соответственно.

Следовательно, описывая зависимость полиномиальной функцией, мы получаем значение констант устойчивости каждой формы из коэффициентов этой функции. Полученные таким образом значения констант представлены в Таблица 4. Уточнение константы устойчивости $[\text{Bi}(\text{OH})\text{BATA}]^{2-}$ не проводили, поскольку эта форма присутствует в щелочной среде, и расчёт этой константы в кислой среде, далеко от значимого количества данной формы, некорректно.

Константы устойчивости всех форм комплекса Bi^{3+} с H_4BATA оказываются несколько выше установленных в ходе потенциометрического титрования за счет проведения эксперимента при низких значениях pH, где метод потенциометрического титрования работает хуже. Поэтому значения полученных констант оказываются выше, но в то же время они более точные, поскольку эксперимент позволил более достоверно определить количества свободного Bi^{3+} . Значения $p\text{Bi}$ для комплекса Bi^{3+} с H_4BATA такие же высокие, как $p\text{Bi}$ для комплекса с H_4DOTA , что демонстрирует высокую устойчивость комплекса Bi^{3+} с H_4BATA . Уточненная диаграмма распределения форм Bi^{3+} в присутствии H_4BATA показана на Рисунок 18.

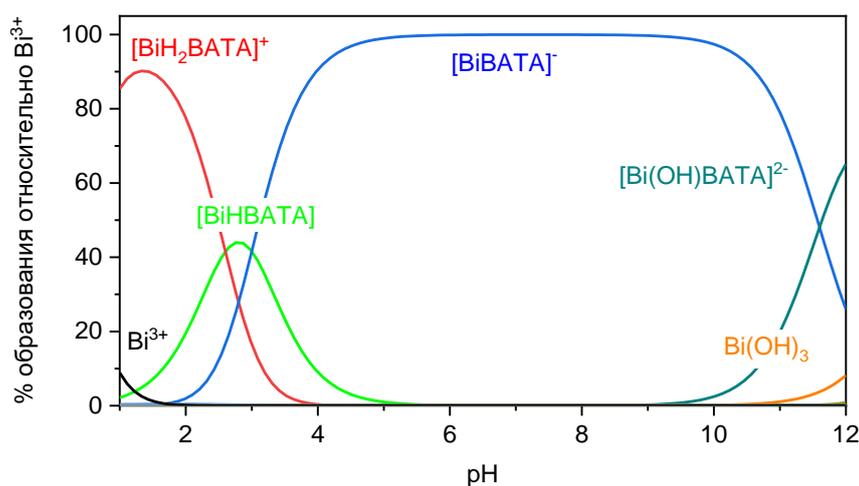


Рисунок 18. Диаграмма распределения форм комплекса Bi^{3+} с H_4BATA в зависимости от pH ($c_L = c_{\text{Bi}} = 0,001 \text{ M}$, в отсутствие хлорид-ионов), полученная с использованием констант устойчивости, полученных методом экстракции.

В литературе константы устойчивости комплексов Bi^{3+} представлены, в основном, для ациклических лигандов, поскольку они, как правило, быстро могут связывать легко гидролизуемый Bi^{3+} . Для сравнения полученного для $[\text{BiBATA}]^-$ значения $p\text{Bi} = 27,2$ со

значениями для комплексов с другими лигандами были посчитаны значения pVi в тех же условиях, используя значения констант устойчивости комплекса и констант протонирования лиганда, приведённые в литературе. Наибольшие значения pVi были получены для комплексов с H_5DTPA (29,7) [116] и $H_4CHXocara$ (29,5) [61], тогда как другие ациклические лиганды характеризуются более низкими значениями pVi : H_2amp (26,0) [62] и H_4ocara (18,8) [61]. Данные о стабильности комплексов с ациклическими лигандами в биологических средах представлены мало. В случае комплекса $[BiDTPA]^{2-}$, показано, что комплекс постепенно диссоциирует уже в сыворотке крови: через 6 ч остаётся 60 % комплекса, несмотря на столь высокое значение pVi [116]. Также на примере комплексов Bi^{3+} с $H_4CHXocara$ и H_4ocara , которые оказываются устойчивы в сыворотке крови по крайней мере в течение 1 сут, мы можем заключить, что pVi не коррелирует с дальнейшей стабильностью в биологических средах. С макроциклическими лигандами наибольшее значение pVi было получено для $H_2Me-do2pa$ (29,5) [117], которое оказывается выше, чем для H_4BATA . Данных по устойчивости *in vivo* комплекса с $H_2Me-do2pa$ нет, но отмечается, что его комплекс устойчив в сыворотке крови по крайней мере в течение 2 ч. Вопрос, достаточно ли стабильности в течение 2 ч (около двух периодов полураспада ^{213}Bi) для применения в составе РФЛП, остаётся дискуссионным, и во многом это зависит от молекулы, с которой в дальнейшем будет проводится конъюгация, поскольку время накопления в целевой ткани коротких пептидов и более крупных антител значительно отличаются. Поэтому стабильность в течение более длительного времени была бы желательной.

3.3 Исследование структуры комплексов Bi^{3+} , La^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA .

В случае комплексов с лигандом H_4BATA не удалось получить монокристаллы комплексов. Поэтому моделирование геометрии комплексных соединений Bi^{3+} , La^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA проводилось путём оптимизации геометрии в программе ORCA методом теории функционала плотности (DFT). Для комплекса $[BiBATA]^-$ были установлены две конформации (Рисунок 19, Таблица 5), присутствие обеих коррелирует со сложным 1H ЯМР спектром $[BiBATA]^-$ в водном растворе (Рисунок Пб). В обеих конформациях комплекса $[BiBATA]^-$ наблюдается расположение атома висмута внутри полости макроцикла, а полученные структуры отличаются расположением ацетатных «рук» относительно полости бензоазакраун-лиганда. Конформация 1 характеризуется координацией атомами кислорода трёх ацетатных групп (O(4), O(6), O(8)) с одной стороны и атомом кислорода четвёртой ацетатной группы (O(10)) - с другой (Рисунок 19а). В конформации 2 две ацетатные группы

располагаются с одной стороны макроцикла (O(4), O(8)) и две (O(6), O(10)) – с другой (Рисунок 19б). Стоит упомянуть, что ввиду делокализации отрицательного заряда нельзя различить атомы кислорода карбоксильной группы, поэтому, например, в координации может участвовать атом кислорода O(3) или O(4) одной ацетатной группы, но для упрощения понимания структуры комплекса, мы принимаем, что конкретный атом кислорода участвует в координации катиона металла. Из-за заполнения координационной сферы четырьмя аминогруппами и четырьмя ацетатами, макроциклические атомы кислорода O(1) и O(2) удаляются от Bi^{3+} на максимально возможное расстояние в полости - 4–5 Å в случае конформации 1 (Таблица 5). В случае конформации 2 расстояние до одного из атомов кислорода макроцикла меньше. Вероятно, это связано с тем, что в случае конформации 2 координация металла в комплексе организована таким образом, что катион глубже входит в полость макроцикла за счёт симметричной координации двух ацетатных групп с одной стороны макроцикла и двух с другой. За счёт этого Bi^{3+} оказывается ближе к атомам кислорода макроцикла, хотя расстояние до них и остаётся слишком высоким для того, чтобы они принимали участие в координации катиона. Отсутствие координации макроциклическими атомами кислорода подтверждается анализом ТАИМ [118], реализованным в пакете multiwfn [119] для комплекса $[\text{BiVATA}]^-$, который показал отсутствие взаимодействия между катионом и макроциклическими кислородами.

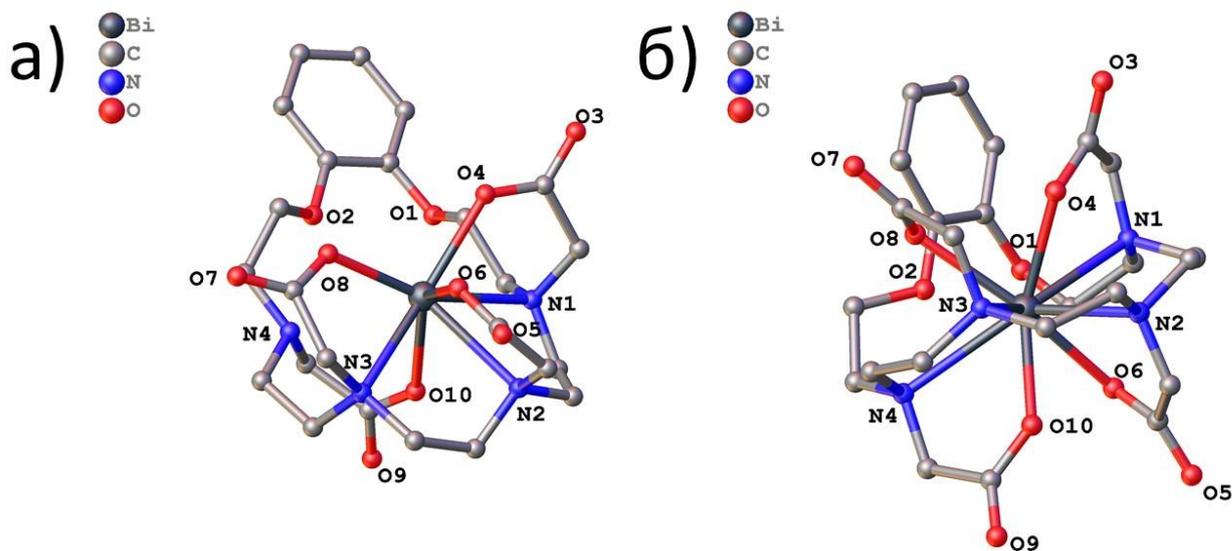


Рисунок 19. Оптимизированные структуры комплекса $[\text{BiVATA}]^-$: а) конформация 1; б) конформация 2.

Аналогично была оптимизирована структура комплекса H_4VATA с La^{3+} , который вновь был использован как аналог Ac^{3+} благодаря близости их химических свойств [56, 105, 109] несмотря на несколько меньший радиус (1,03 и 1,12 Å для La^{3+} и Ac^{3+} соответственно, КЧ

6 [120]), ввиду трудности расчётов для катионов актиноидов. Однако моделирование структуры комплекса с Ac^{3+} также было проведено, с использованием релятивистской аппроксимации, но стоит отметить, что для того, чтобы избежать проблем сходимости вычислений, использовался базисный набор, который может привести к снижению точности вычислений.

Таблица 5. Межатомные расстояния [Å] Bi^{3+} , La^{3+} и Ac^{3+} в координационном окружении их комплексов с H_4BATA согласно оптимизированным геометриям.

	Bi^{3+}		La^{3+}		Ac^{3+}	
	Конф-я 1	Конф-я 2	Конф-я 1	Конф-я 2	Конф-я 1	Конф-я 2
M—N(1)	2,933	2,743	2,780	2,784	2,855	3,010
M—N(2)	2,552	2,495	2,742	2,639	2,829	2,760
M—N(3)	2,691	2,499	2,676	2,625	2,761	2,753
M—N(4)	2,730	2,733	2,905	2,749	2,970	2,966
M—O(4)	2,458	2,388	2,452	2,526	2,497	2,544
M—O(6)	2,322	2,418	2,445	2,444	2,481	2,577
M—O(8)	2,341	2,420	2,456	2,565	2,492	2,572
M—O(10)	2,305	2,484	2,451	2,536	2,488	2,541
M—O(1)	4,785	4,344	4,686	4,159	4,612	2,774
M—O(2)	4,413	2,909	4,124	2,737	3,906	2,784

В случае обоих комплексов H_4BATA с La^{3+} и Ac^{3+} также было установлено две конформации, которые отличаются расположением ацетатных групп относительно катиона. Рисунок 20 демонстрирует включение катионов La^{3+} и Ac^{3+} внутрь полости макроцикла, как и в случае комплекса с Bi^{3+} .

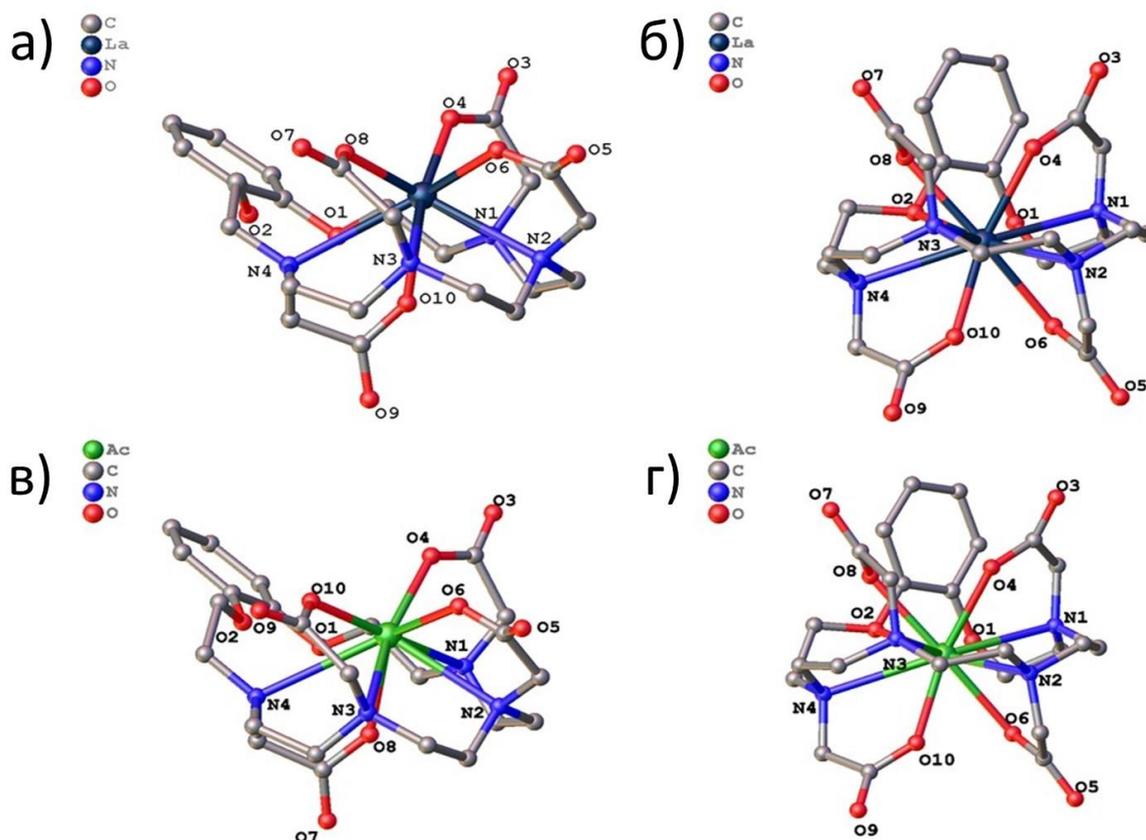


Рисунок 20. Оптимизированные структуры комплекса $[LaBATA]^-$ конформации 1 (а) и конформации 2 (б) и комплекса $[AcBATA]^-$ конформации 1 (в) и конформации 2 (г).

Длины связей (Таблица 6) в комплексах La^{3+} и Ac^{3+} с атомами азота макроцикла и атомами кислорода карбоксильных групп (O(4), O(6), O(8) и O(10)) оказываются в среднем больше, чем у Bi^{3+} в комплексе $[BiBATA]^-$. Кроме того, в отличие от комплекса с висмутом, атомы кислорода макроцикла в комплексах $[LaBATA]^-$ и $[AcBATA]^-$ расположены ближе, и O(2) может влиять на координацию катиона внутри полости. А в случае конформации 2 комплекса $[AcBATA]^-$ расстояния до обоих атомов кислорода макроцикла сопоставимы с расстояниями до атомов азота макроцикла и атомов кислорода ацетатных групп, следовательно оба атома кислорода в этом случае могут участвовать в координации Ac^{3+} в комплексе. Также данный факт косвенно указывает на то, что достаточно крупная полость макроцикла 18-краун-6 (диаметр 2,6–3,2 Å [53]) может больше подходить крупному трёхзарядному катиону Ac^{3+} (ионный радиус 1,12 Å, КЧ 6 [120]) для его эффективной координации с включением внутри полости макроцикла, по сравнению с катионами, обладающими меньшим ионным радиусом. В этом случае катион Ac^{3+} будет лучше экранирован от конкурирующих катионов или биологических молекул, что увеличивает стабильность комплекса в организме.

Полученные структуры комплексов и длины связей можно сравнить с комплексами известных лигандов с Bi^{3+} и La^{3+} . В комплексе La^{3+} с лигандом H_4octaPa , как и H_4BATA , имеет 4 донорных атома азота и 4 карбоксильных атома кислорода, координирующих катион металла. H_4octaPa - ациклический лиганд, и его структура более гибкая по сравнению с макроциклическим лигандом. Длины связей с атомами азота алифатического амина больше, чем с пиколинатными атомами азота [60]. В то же время длины связей La^{3+} как с атомами азота, так и с атомами кислорода очень близки к таковым для комплекса с H_4BATA , предположительно потому, что согласно геометрии, оптимизированной DFT, в структуре комплекса $[\text{LaBATA}]^- \text{La}^{3+}$ входит в полость макроцикла, и координирующие атомы также расположены вокруг катиона металла.

По сравнению с комплексом La^{3+} с $\text{H}_2\text{macroPa}$ [56], $[\text{LaBATA}]^-$ имеет более короткие длины связей с координирующими макроциклическими атомами, несмотря на ту же макроциклическую полость 18-краун-6. Кроме того, для обеих конформаций комплекса $[\text{LaBATA}]^-$ реализуются более короткие расстояния до атомов кислорода координирующих карбоксильных групп из-за более компактной ацетатной группы по сравнению с пиколинатной. Кроме того, средние длины связей La^{3+} с атомами азота макроцикла (2,738 Å) и с атомами кислорода боковых координирующих карбоксильных групп (2,484 Å) $[\text{LaBATA}]^-$ практически идентичны длинам связей комплекса $[\text{LaDOTA}]^-$ (2,795 и 2,493 Å соответственно) с КЧ = 9 ($\text{Na}[\text{La}(\text{DOTA})\text{La}(\text{HDOTA})] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) [121], поскольку H_4DOTA имеет склонность к образованию девятикоординированных комплексов лантаноидов(III) с общей формулой $[\text{M}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ [122, 123]. Сходство структуры и длин связей может свидетельствовать об аналогичной устойчивости комплексов.

Кроме того, для детального понимания процесса комплексообразования было исследовано изменение координационного окружения Bi^{3+} в комплексе с H_4BATA при различных значениях pH с помощью спектроскопии протяжённой тонкой структуры рентгеновского поглощения EXAFS растворов при значениях pH 1, 3, 5,0 – 5,5 и 11 (Рисунок П7, Таблица б). В образце при pH 1 полученное расстояние 2,68 Å соответствует связи Bi-Cl в аналогичных соединениях [124], расстояния 2,33 Å до легких атомов можно отнести к гидратной оболочке. Согласно полученным расстояниям при разных значениях pH, уменьшение и увеличение pH вызывает увеличение числа ближайших соседей по отношению к координации при pH 5,0 – 5,5. В случае pH 3 КЧ = 4 на расстоянии 2 – 3 Å обусловлено неполным связыванием катиона донорными атомами лиганда за счет протонирования, что видно из диаграммы распределения форм комплекса (Рисунок 18). Катион частично окружен молекулами растворителя и в спектрах наблюдаются пики

большого количества легких атомов. При повышении рН, в диапазоне рН 5,0 – 5,5 существуют как монопротонированная, так и депротонированная формы комплекса с преобладанием последних, и катион внедряется в полость макроцикла в соответствии с расчетной структурой DFT. Наконец, при максимальном рН 11 катион висмута начинает гидролизываться, и внешние ОН-группы способствуют постепенному выходу катиона из окружения донорными атомами лиганда, увеличивая количество ближайших легких атомов, как и в случае более низкого рН 3. Данная трактовка изменений структуры в зависимости от значений рН согласуется с диаграммой распределения форм комплекса (Рисунок 18), полученной методами потенциометрического титрования и экстракции: депротонирование лиганда вызывает включение катиона в полость, в то время как протонированные формы, а также гидроксидные формы приводят к выходу катиона из полости макроцикла. Подобные изменения в структуре аналогичны комплексообразованию с H_4DOTA [125, 126], но значительно больший размер макроцикла H_4BATA создаёт гораздо меньше ограничений для депротонирования и последующего внедрения висмута внутрь макроциклической полости лиганда.

Таблица 6. Межатомные расстояния и координационные числа, полученные из спектров EXAFS катиона Bi^{3+} в комплексе с H_4BATA при разных значениях рН.

	рН 1			рН 3			рН 5,0-5,5			рН 11		
Координационная оболочка	R, Å	CN	σ , Å ²	R, Å	CN	σ , Å ²	R, Å	CN	σ , Å ²	R, Å	CN	σ , Å ²
Bi—C/N/O	2,33 ± 0,01	3	0,005 ± 0,002	2,32 ± 0,002	4	0,006 ± 0,002	2,17 ± 0,01	3	0,0045 ± 0,0006	2,36 ± 0,03	4	0,005 ± 0,003
Bi—C/N/O	-	-	-	2,53 ± 0,02	4	0,004 ± 0,001	2,47 ± 0,02	2	0,007 ± 0,003	2,61 ± 0,03	6	0,004 ± 0,003
Bi—C/N/O	3,18 ± 0,03	3	0,006 ± 0,004	3,20 ± 0,03	4	0,007 ± 0,003	3,15 ± 0,02	3	0,005 ± 0,003	3,29 ± 0,03	6	0,005 ± 0,002
Bi—C/N/O	4,19 ± 0,07	3	0,005 ± 0,005	4,78 ± 0,03	3	0,002 ± 0,004	3,45 ± 0,06	1	0,005 ± 0,003	-	-	-

Bi—C/N/O	4,54 ± 0,06	4	0,003 ± 0,005	4,64 ± 0,07	7	0,005 ± 0,011	4,31 ± 0,03	6	0,005 ± 0,007	4,64 ± 0,06	8	0,007 ± 0,007
Bi—C/N/O							4,51 ± 0,09	2	0,004 ± 0,025			
Bi—Cl	2,68 ± 0,03	1	0,009 ± 0,006	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4 Синтез и определение радиохимической чистоты комплексов Bi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA

Синтез и определение РХЧ комплекса $[\text{}^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}^-$

Для РФЛП важно быстрое связывание катиона металла в комплекс. Это особенно важно для терапевтических изотопов ^{212}Bi и ^{213}Bi , которые имеют довольно короткий период полураспада (61 и 46 минут соответственно). Поэтому хелатирующий агент в составе конъюгата с биомолекулой должен быстро и с высоким выходом координировать катион металла и, желательно, в мягких условиях, чтобы избежать разрушения биомолекулы. Тем не менее, эффективность связывания металла в комплекс может существенно отличаться при разных температурах, а реакция может заметно протекать лишь при высоких температурах, как в случае с H_4DOTA [24, 30, 127, 128]. Следовательно, эффективность связывания Bi^{3+} в комплекс с H_4BATA определяли при комнатной температуре и при 80°C , время выдержки составило 1 ч. Для удобства использовали ^{207}Bi , и его количественное связывание с лигандом H_4BATA определяли с помощью ТСХ. Для этого к раствору H_4BATA (от 1,0 мкМ до 770 мкМ) при pH 6 добавляли раствор радиоактивной метки $[\text{}^{207}\text{Bi}]\text{BiCl}_3$.

В подобранных условиях анализа методом ТСХ комплекс H_4BATA с радиоактивной меткой ^{207}Bi имеет фактор удерживания $R_f = 0,9$, тогда как свободный Bi^{3+} остается на стартовой линии с $R_f = 0$ (Рисунок 21).

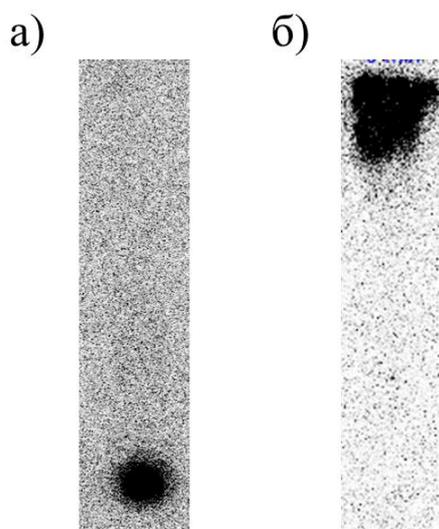


Рисунок 21. Изображения хроматографических пластин с образцами, полученных методом цифровой радиографии а) образец ^{207}Bi без добавления лиганда; б) образец ^{207}Bi в избытке лиганда H_4BATA .

Радиохимическая чистота комплекса Bi^{3+} с H_4BATA сразу после приготовления (через 2-3 мин) и после выдерживания в течение 1 ч при pH 6 и $c_L = 1$ мкМ при комнатной температуре не менялась. Также радиохимическая чистота в пределах погрешности не зависела от температуры: 44% при 80°C и 49% при комнатной температуре (pH 6, $c_L = 1$ мкМ, время выдержки 1 ч). По известным данным [125], медленная скорость комплексообразования H_4DOTA обусловлена медленным депротонированием атомов азота макроцикла: при комплексообразовании на примере лантаноидов показано, что сперва быстро образуется протонированные интермедиаты (максимально протонируются лишь два атома азота макроцикла, поэтому может образовываться комплекс с общей формулой $[\text{LnH}_2\text{DOTA}]^+$), в которых катион координирован преимущественно атомами кислорода боковых карбоксильных групп, и КЧ = 9 обеспечивается за счёт молекул воды в окружении катиона, а самая медленная стадия – полное депротонирование лиганда (уход протона от атома азота макроцикла) и одновременное включение катиона в полость макроцикла, окружённую ацетатными «руками», с образованием конечной, устойчивой формы комплекса $[\text{LnDOTA}]^-$. В случае же H_4BATA быстрое комплексообразование обеспечивается гораздо меньшей жесткостью макроцикла азакраун-эфира из-за большего размера 18-краун-6 H_4BATA по сравнению с 12-краун-4 H_4DOTA : депротонирование атомов азота макроцикла 18-краун-6 протекает быстрее, и, следовательно, катион металла также быстрее входит в полость макроцикла с образованием комплекса состава $[\text{MBATA}]^-$. По этой причине все

эксперименты по комплексообразованию H_4BATA с Bi^{3+} проводились при комнатной температуре без дополнительного времени выдержки.

Поскольку значение рН также может влиять на долю связанного в комплекс металла вследствие гидролиза катиона и протонирования/депротонирования лиганда, была проведена оценка радиохимической чистоты комплекса Bi^{3+} с H_4BATA при значениях рН 6 и рН 8 и различных концентрациях лиганда. Можно отметить лишь небольшое снижение выхода реакции образования комплекса при более высоких значениях рН. Более низкий выход, вероятнее всего, обусловлен чрезвычайной склонностью к гидролизу Bi^{3+} , что в данном случае оказывает преобладающее влияние по сравнению с повышением содержания депротонированной формы [129]. Тем не менее, эти различия нельзя назвать значительными. Выход реакции достигал более 96% при рН 6 и концентрации H_4BATA 77-100 мкМ (Таблица 7). Доля комплекса в растворе ($c_L = 100$ мкМ) не зависела от выбора буферной системы и оставалась той же в буфере MES, а также в фосфатном, бикарбонатном и ацетатном буфере, что означает, что ни одна из этих буферных систем не влияет на комплексообразование. Это позволяет при необходимости использовать любую из них.

Таблица 7. Радиохимическая чистота комплекса $^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}^-$ при разных концентрациях лиганда при рН 6 и 8.

$c(\text{H}_4\text{BATA}),$ мкМ	1	5	10	77	100	300	500	770
рН 6	49±5%	64±6%	88±5%	96±4%	95±5%	95±5%	97±3%	95±5%
рН 8	61±6%	63±5%	70±5%	76±4%	78±6%	-	-	95±5%

В последние годы исследуются новые лиганды для связывания Bi^{3+} , и получены данные по эффективности их радиоактивного мечения. Среди таких лигандов представлены различные ациклические лиганды с пиколинатными координирующими группами: $\text{H}_4\text{neupra-NH}_3$ [130], H_4octara и $\text{H}_4\text{CHXoctara}$ [61], H_2ampra [62]. H_4BATA наиболее близко расположена к H_4octara и $\text{H}_4\text{CHXoctara}$ по эффективности мечения. Лиганд H_2ampra полностью связывал Bi^{3+} при концентрациях лиганда выше 1 мкМ, а наибольшую эффективность продемонстрировал лиганд $\text{H}_4\text{neupra-NH}_3$, который полностью связывал Bi^{3+} при концентрациях лиганда выше 10 нМ. Однако стоит отметить, что в качестве метки использовали различные изотопы висмута, которые значительно отличаются по величине периодов полураспада: ^{213}Bi ($T_{1/2} = 46$ мин) – в случае $\text{H}_4\text{neupra-NH}_3$ и H_2ampra , $^{205/206}\text{Bi}$ ($T_{1/2} = 15,31$ и $6,24$ сут соответственно) – в случае H_4octara и $\text{H}_4\text{CHXoctara}$. Чем больше период полураспада, тем большее количество катионов Bi^{3+} вступает в реакцию мечения: для

полного связывания бóльшего количества Bi^{3+} требуется больше лиганда. Можно примерно оценить, какие количества Bi^{3+} были использованы в экспериментах по радиоактивному мечению, исходя из используемой активности для каждого эксперимента. Разница в используемых концентрациях ^{213}Bi в экспериментах с $\text{H}_4\text{neupra-NH}_3$ и H_2amra составляет более одного порядка (т.е. концентрация Bi^{3+} в экспериментах с $\text{H}_4\text{neupra-NH}_3$ была больше), но при этом $\text{H}_4\text{neupra-NH}_3$ всё равно метится более эффективно, что однозначно указывает на бóльшую эффективность мечения этого лиганда по сравнению с H_2amra . Однако, когда мы переходим к сравнению с H_4octara и $\text{H}_4\text{CHXoctara}$, где использовалась смесь более долгоживущих изотопов $^{205/206}\text{Bi}$, то можем увидеть, что разница в концентрации Bi^{3+} , используемой в экспериментах с $\text{H}_4\text{neupra-NH}_3$, составляет уже почти 3 порядка, а в случае ^{207}Bi , который использовался в экспериментах с H_4BATA , она ещё выше. Поэтому наиболее корректно можно сравнить эффективность мечения H_4octara и $\text{H}_4\text{CHXoctara}$ и H_4BATA , для которых использовался один порядок концентрации Bi^{3+} , и мы видим, что H_4BATA связывает Bi^{3+} с чуть меньшей эффективностью, но всё ещё очень высокой. В любом случае, данные рассуждения носят оценочный характер и для корректной оценки необходимо использовать один и тот же изотоп одинаковой чистоты.

Среди макроциклических лигандов эффективность мечения изотопами висмута была определена для ацетатного H_4DOTA [62], [65] и пиколинатными 18-азакраун-6 эфирами $\text{H}_2\text{macropa}$, $\text{H}_2\text{macrodira}$ и $\text{H}_2\text{py-macrodira}$ [131]. Макроциклические лиганды с пиколинатными координирующими группами можно расположить в следующем порядке по эффективности мечения Bi^{3+} : $\text{H}_2\text{py-macrodira} > \text{H}_2\text{macropa} > \text{H}_2\text{macrodira}$. По-видимому, $\text{H}_2\text{py-macrodira}$ эффективнее связывает Bi^{3+} за счёт того, что в структуре макроцикла вместо жёсткого атома кислорода присутствует более мягкий атом азота пиридина, лучше координирующий Bi^{3+} , который является пограничным катионом согласно принципу жёстких и мягких кислот и оснований. H_4DOTA полностью связывает Bi^{3+} при концентрациях выше 1 мкМ, но при этом требуется нагревание до 90°C . $\text{H}_2\text{py-macrodira}$ полностью связывает Bi^{3+} при концентрациях выше 0,1 мкМ, тогда как H_4BATA – при концентрациях выше 10 мкМ. Однако разница в используемых концентрациях Bi^{3+} составляет 3-4 порядка, что не позволяет напрямую сравнивать эффективность связывания Bi^{3+} , но указывает на высокую эффективность мечения обоих лигандов.

Синтез и определение РХС комплекса $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$

Для определения эффективности связывания Ac^{3+} с H_4BATA важно отметить проблему получения чистого Ac^{3+} . Проблема органических примесей после выделения различных радиоизотопов Ac^{3+} с помощью смолы на основе N,N,N',N' -тетра-*n*-октилдигликольаамида (DGA) упоминается в ряде технических протоколов и научных работ [71, 132, 133]. По-видимому, способ получения радиоизотопов Ac^{3+} неизбежно влияет и на чистоту получаемого раствора с радионуклидом. В наших исследованиях мы также заметили негативное влияние органических примесей на эффективность связывания Ac^{3+} после стандартного выделения на смоле DGA для обоих радиоизотопов ^{225}Ac и ^{228}Ac . Попытки избавиться от органических примесей путем окислительного разложения концентрированной азотной кислотой и царской водкой не увенчались успехом, что привело к применению смолы дополнительной фильтрации (prefilter) для очистки полученных растворов Ac^{3+} от органических примесей.

Эффективность связывания ^{228}Ac лигандами H_4BATA и H_4DOTA определяли методом ТСХ. Растворы готовили в 0,01 М буфере MES при pH 6,5 для полного комплексообразования. Свежеприготовленный раствор $[\text{}^{228}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ (3 кБк) с генератора $^{228}\text{Ra}/^{228}\text{Ac}$ смешивали с раствором лиганда H_4BATA или H_4DOTA , время выдержки составило 19 ч при 25°C (H_4BATA) или при 90°C (H_4DOTA) для полного комплексообразования. Радиохимическая чистота образующихся комплексов с H_4DOTA (50 нМ – 100 мкМ) и H_4BATA (335 нМ – 100 мкМ) показана на рисунке 25.

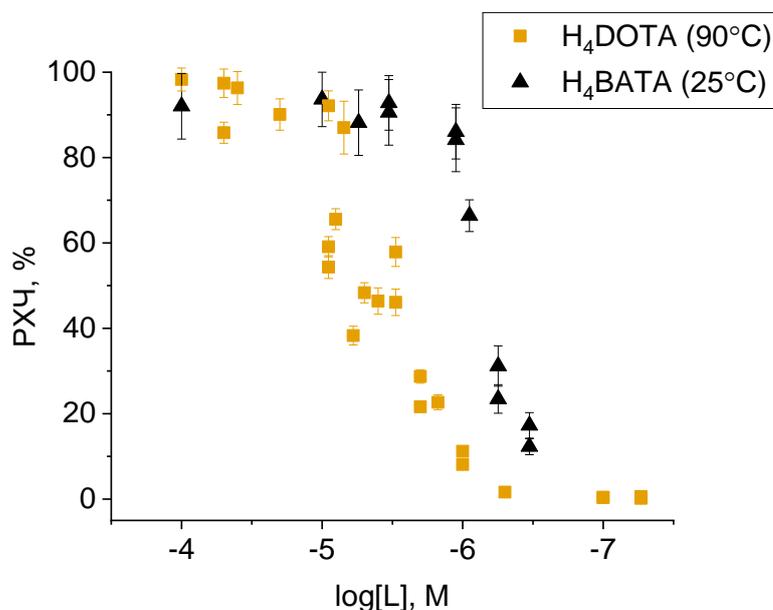


Рисунок 22. Зависимость степени мечения ^{228}Ac (радиохимической чистоты, %) лигандов H_4DOTA (90°C) и H_4BATA (25°C) в 0,01 М буфере MES, pH 6,5 (0,01 М, pH 6,5). от концентрации лиганда.

Как видно из Рисунок 22 концентрации H_4BATA порядка мкМ позволяли полностью связать ^{228}Ac , тогда как для полного связывания ^{228}Ac с H_4DOTA требовались концентрации примерно на порядок выше при 90°C .

Для корректной оценки было также проведено радиоактивное мечение лигандов H_4BATA и H_4DOTA одной и той же порцией $[\text{}^{228}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ (3 кБк) с генератора $^{228}\text{Ra}/^{228}\text{Ac}$ (чтобы уравнивать влияние возможных следов органических примесей на эффективность мечения даже после очистки смолой prefilter). Одну и ту же порцию ^{228}Ac по отдельности смешали с H_4BATA и H_4DOTA с фиксированной концентрацией лиганда 2 мкМ и наблюдали, как меняется степень мечения каждого лиганда при 25, 45 и 90°C с течением времени. Радиохимические выходы в зависимости от времени синтеза при различных температурах представлены на Рисунок 23.

При 25°C не происходит образование комплекса с H_4DOTA , в то время как H_4BATA связывает более 35% ^{228}Ac сразу после приготовления образца. Нагревание реакционной смеси при 90°C увеличивало связывание ^{228}Ac лигандом H_4BATA до 60%, в то время как выход реакции комплексообразования с H_4DOTA оставался менее 10%.

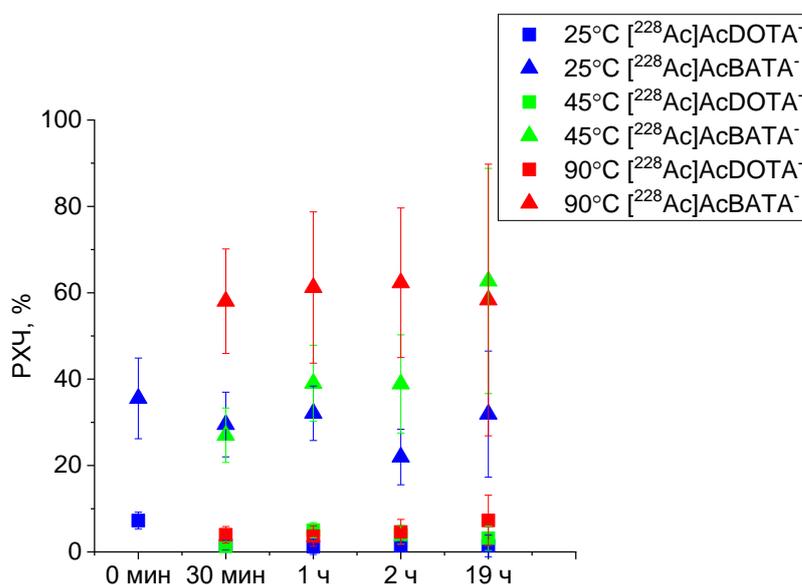


Рисунок 23. Радиохимическая чистота комплексов H_4DOTA и H_4BATA ($c_L = 2$ мкМ) с $[\text{}^{228}\text{Ac}]\text{Ac}^{3+}$ при различных температурах и времени выдержки.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что H_4BATA обладает высокой скоростью связывания Ac^{3+} уже при комнатной температуре. При необходимости можно использовать нагревание для ещё более эффективного связывания катиона. Второй вывод заключается в том, что H_4BATA связывает Ac^{3+} при более низкой концентрации лиганда, чем H_4DOTA , и

подобная тенденция сохраняется даже при высоких температурах, что согласуется с более высокими значениями констант устойчивости и pM для формы комплекса $[AcBATA]^-$ по сравнению с $[AcDOTA]^-$. Этот факт указывает на большее сродство большого катиона Ac^{3+} к лиганду H_4BATA с большей полостью макроцикла, чем у H_4DOTA . Кроме того, макроцикл лиганда H_4BATA обладает более подвижной структурой, вследствие чего депротонирование атомов азота протекает легче, что приводит к более быстрому комплексообразованию. Таким образом, H_4BATA демонстрирует отличную эффективность и скорость связывания Ac^{3+} при микромолярных концентрациях лиганда, в то время как H_4DOTA значительно уступает H_4BATA по параметрам комплексообразования.

В литературе по тематике исследования комплексов с Ac^{3+} не приведены константы устойчивости, за исключением одной работы, где константу устойчивости $[AcDOTA]^-$ определяли методом ТСХ [71]. Следовательно, сравнение данных по радиоактивному мечению остаётся единственным способом наглядно и количественно оценить сродство различных лигандов по отношению к Ac^{3+} . Основываясь на данные работ по радиоактивному мечению лигандов с пиколиновыми координирующими группами, по эффективности комплексообразования с Ac^{3+} H_4BATA можно поставить после комплексов с такими лигандами, как $H_4CHXостара$ и $H_2масгора$, чьи радиохимические выходы несколько выше (для полного связывания Ac^{3+} требуется примерно в 3 раза меньшие концентрации лигандов), в то время как $H_4остара$, $H_4neupра$ и другие пиколиновые лиганды характеризуются более низкой степенью мечения Ac^{3+} [134]. Также наблюдается примерно одинаковая эффективность радиоактивного мечения H_4BATA и $H_4ру4ра$ [63], что согласуется с высокими значениями pM обоих комплексов с La^{3+} , как обсуждалось в разделе 3.2. Стоит отметить, что за исключением $H_2масгора$ все указанные лиганды с пиколиновыми группами - ациклические, и традиционно характеризуются высокими значениями pM и констант устойчивости. Проведённое в разделе 3.2 сравнение значений pM комплексов с La^{3+} показало, что значение для комплекса с H_4BATA превосходит значения pM комплексов с $H_2амра$, $H_4остара$ и $H_4neupра$, и несколько уступает $H_4ру4ра$ – как видим, эти данные закономерно согласуются с данными по эффективности мечения Ac^{3+} : чем выше константа устойчивости, тем выше эффективность мечения. Что касается макроциклических 18-азакраун-6 лигандов H_4PYTA и $H_2масгора$, то данных по мечению H_4PYTA Ac^{3+} нет, а в случае $H_2масгора$ мы наблюдаем расхождение: $pM [LaBATA]^-$ (19,9) выше $pM [La(масгора)]^+$ (15,5), но при этом для полного связывания Ac^{3+} требуется примерно в 3 раза большие концентрации H_4BATA , по сравнению с $H_2масгора$. Можно предположить, что данное расхождение обусловлено высокой селективностью $H_2масгора$

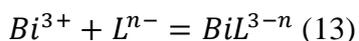
именно по отношению к As^{3+} в присутствии других катионов, которые неизбежно присутствуют в растворах в следовых количествах. В работах, посвящённых исследованию комплексообразования $H_2macropa$, указывается лишь высокая кинетическая инертность уже образовавшегося комплекса $[As(macropa)]^+$ в присутствии избытка La^{3+} , что не говорит о селективности данного лиганда именно по отношению к As^{3+} , и этот момент должен быть изучен отдельно. Другое объяснение несогласованности полученных данных с La^{3+} и As^{3+} может лежать в области самого эксперимента, а именно – в различной чистоте используемого As^{3+} . Однако стоит упомянуть, что анализ на примеси металлов в растворе ^{228}As показал, что суммарное содержание устойчивых примесей не превышало 5 ppm (Таблица 1), а для удаления возможных органических примесей мы использовали те же методики, что и изложенные в литературе, с дополнительной очисткой на смоле prefilter.

3.5 Сравнение скорости образования и диссоциации комплекса Vi^{3+} с H_4BATA с типовыми комплексами. Определение механизма протон-ассоциированной диссоциации

Помимо образования высоко устойчивого комплекса важную роль играет скорость комплексообразования. Кинетическая инертность комплекса также имеет решающее значение при создании РФЛП, поскольку важно гарантировать, что после введения в организм радионуклид не высвобождается и не оказывается в здоровых органах и тканях.

Некоторые исследования кинетики комплексообразования Vi^{3+} с H_4DOTA уже были проведены [49]. Поэтому было проведено лишь несколько экспериментов для адекватного сравнения комплексообразования и диссоциации комплексов с H_4DOTA и H_4BATA в одинаковых условиях. Кроме того, мы провели несколько экспериментов с H_5DTPA в тех же условиях, используя его в качестве эталона известного лиганда, обладающего высокой скоростью комплексообразования.

Реакцию образования комплекса в упрощенном виде можно описать уравнением:



А протон-ассоциированную диссоциацию комплекса уравнением:



Реакции протекают в условиях псевдопервого порядка: обеспечивается избыток лиганда или протонов в случае комплексообразования или диссоциации соответственно. Поэтому изменением их концентрации в ходе реакции можно пренебречь.

Кинетику комплексообразования Bi^{3+} исследовали методом спектроскопии поглощения в УФ области в присутствии $0,1 \text{ M H}^+$ и $I = 0,6 \text{ M (H,K)Cl}$ для предотвращения образования гидроксидов и коллоидов свободного Bi^{3+} , обеспечивая, таким образом, растворённую форму катиона для комплексообразования. Мы следили за реакциями, используя пик поглощения комплексной формы BiCl_4^- (Рисунок ПЗ) или пик комплекса с H_4BATA .

На Рисунок 24 видно, что комплекс Bi^{3+} с H_5DTPA образуется в первые секунды реакции (резкое снижение поглощения пика BiCl_4^- до базовой линии), при этом наблюдается лишь небольшое образование комплекса с H_4DOTA и содержание комплекса практически не увеличивается даже через сутки (на Рисунок 24 данная точка не представлена, поскольку в этом случае требовалось переносить раствор из кюветы и снимать спектр при новой работе прибора, из-за чего создавалась экспериментальная погрешность, и данная точка измерялась лишь для дополнительного подтверждения тенденции, представленной на рисунке). Согласно диаграмме распределения для системы Bi-DOTA при $\text{pH } 1$ (Рисунок П9) (в условиях изучения кинетики образования) присутствуют только формы хлорида висмута, поэтому образование формы комплекса $[\text{BiDOTA}]^-$ не должно наблюдаться. Однако возможно существование протонированной формы комплекса при кислом pH , константа устойчивости для которых не определена. В данном случае отсутствие комплексообразования можно объяснить тем, что H_4DOTA имеет низкую скорость связывания из-за жесткой структуры, и комплексообразование с H_4DOTA может быть облегчено путём повышения pH и при нагревании. Также согласно диаграмме распределения для системы Bi-DTPA в условиях изучения кинетики образования (Рисунок П11) около 60% комплекса должно наблюдаться при $\text{pH } 1$, в то время как наблюдается полное связывание Bi^{3+} в комплекс в течение нескольких секунд в ходе экспериментов (Рисунок 24). Можно предположить, что мы имеем дело также с протонированной формой комплекса, которая не описана в литературе из-за трудности надежного установления константы устойчивости $[\text{BiHDTPA}]^-$. Другое объяснение может заключаться в том, быстро образующийся комплекс диссоциирует, но в пределах наблюдаемого времени не успевает прийти к равновесию. Можно заключить, что H_5DTPA более кинетически лабилен из-за своей ациклической структуры, что позволяет этому лиганду быстро связывать катион Bi^{3+} . Комплексообразование Bi^{3+} с H_4BATA в тех же условиях происходит в течение нескольких минут (Рисунок 24).

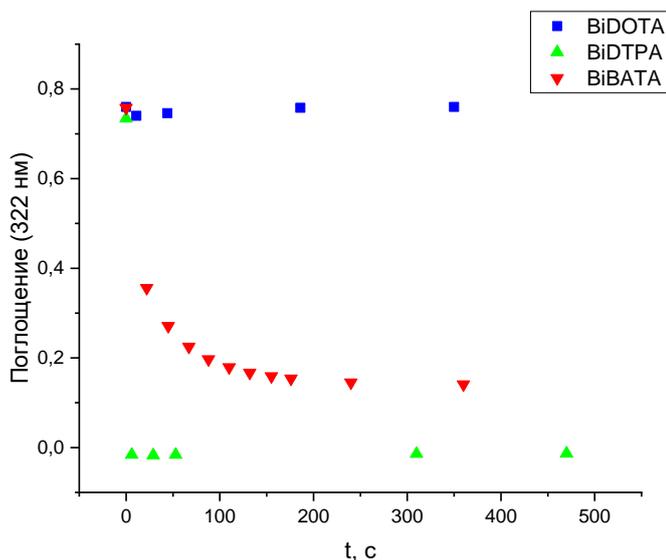


Рисунок 24. Образование комплексов: изменение пика поглощения BiCl_4^- (322 нм) при комплексообразовании в 10-кратном избытке лиганда (H_4DOTA , H_5DTPA или H_4BATA) в 0,1 М HCl и 25°C : с течением времени.

Подобно H_4DOTA и H_5DTPA , согласно диаграмме распределения (Рисунок П8) мы не должны ожидать образования комплекса при pH 1, однако мы наблюдали почти полное связывание Bi^{3+} в ходе экспериментов. Аналогично можно предположить, что все же имеется какое-то содержание трипротонированной формы комплекса или что скорость комплексообразования превосходит скорость диссоциации комплекса. Это делает макроциклический лиганд H_4BATA больше похожим на ациклический лиганд H_5DTPA , а не на макроциклический H_4DOTA , который не связывает Bi^{3+} в тех же условиях. Этот факт можно объяснить большим размером макроцикла H_4BATA , благодаря чему молекула становится более подвижной, чем H_4DOTA .

Для изучения протон-ассоциированной диссоциации комплексов сначала их получали при pH 6-7, а затем помещали в среду с pH 1. На Рисунок 25а видно, что заметной диссоциации комплексов Bi^{3+} с H_4DOTA и H_5DTPA в 0,1 М HCl не происходит. Доля комплекса практически не меняется даже спустя сутки. Однако, основываясь на известных константах устойчивости и диаграмме распределения Bi^{3+} в присутствии H_4DOTA в условиях проведения эксперимента (Рисунок П10), мы можем утверждать, что термодинамически в случае комплекса Bi^{3+} с H_4DOTA не должно присутствовать комплексной формы, а должен присутствовать только свободный Bi^{3+} при pH 1. Однако, возможно существование протонированной формы комплекса, константу устойчивости которой определить не удаётся. Тот факт, что при комнатной температуре и pH 1 заметной диссоциации Bi^{3+} с

H_4DOTA не наблюдается, можно объяснить низкой скоростью диссоциации комплекса при комнатной температуре, из-за которой термодинамическое равновесие в этих условиях не достигается даже спустя сутки. Этот вывод согласуется с изложенным в литературе наблюдением: комплекс Bi^{3+} с H_4DOTA более устойчив к перехелатированию Bi^{3+} биомолекулами *in vivo*, чем, например, комплекс Bi^{3+} с H_5DTPA [27], несмотря на то, что термодинамическая константа устойчивости депротонированной формы $[BiDOTA]^-$ ниже константы устойчивости $[BiDTPA]^{2-}$. Другим объяснением высокой кинетической стабильности комплекса Bi^{3+} с H_4DOTA является связывание катиона в протонированные формы комплекса при низких значениях pH, для которых стехиометрии и константы устойчивости еще не определены.

В случае диссоциации комплекса Bi^{3+} с H_5DTPA , основываясь на известных константах устойчивости и диаграмме распределения Bi^{3+} в присутствии H_5DTPA в условиях проведения эксперимента (Рисунок П11), с термодинамической точки зрения примерно половина от исходного количества комплекса должна была диссоциировать. Ациклические лиганды обладают более подвижной структурой, поэтому данный факт вряд ли может быть связан с низкой скоростью диссоциации, из-за которой не достигается термодинамическое равновесие как в случае с H_4DOTA . Наиболее вероятно, что это связано с очень высокими абсолютными значениями константы устойчивости. В работе [116] установленное значение константы устойчивости формы $[BiDTPA]^{2-}$ составило $lgK = 35,2 \pm 0,2$. При этом достоверно известно существование как моно-, так и дипротонированной формы комплекса в кислой среде. В случае формы $[BiHDTPA]^-$ происходит присоединение протона к одной из крайних карбоксильных групп, которая не принимает участия в координации иона Bi^{3+} , поэтому катион продолжает надёжно координироваться остальными карбоксильными группами и атомами азота. В случае формы $[BiH_2DTPA]$, как видно из рентгеноструктурного анализа, одна из координирующих групп протонируется, продолжая частично координировать висмут, и дополнительный атом кислорода соседней молекулы участвует в координации катиона [135]. В совокупности это делает комплекс Bi^{3+} с H_5DTPA устойчивым к диссоциации в кислой среде.

Диссоциация комплекса с H_4BATA протекает быстрее, чем комплексов с H_4DOTA и H_5DTPA : система достигает равновесия примерно через 10 минут, и почти половина всего комплекса с H_4BATA диссоциирует (Рисунок 25б). С учетом данных диаграммы распределения (Рисунок 26) мы наблюдаем ту же картину, что и для систем Bi^{3+} с H_4DOTA и H_5DTPA : с термодинамической точки зрения мы не должны наблюдать присутствие комплекса, тогда как в условиях кинетического эксперимента мы видим присутствие

примерно половины от исходного количества комплекса, что может быть связано с существованием как высокопротонированной формы комплекса, константу устойчивости для которой определить крайне затруднительно, так и с тем, что уже полученные высокие абсолютные значения констант устойчивости форм комплекса на самом деле ещё выше, и необходимо искать дополнительные методы для уточнения значений термодинамических констант.

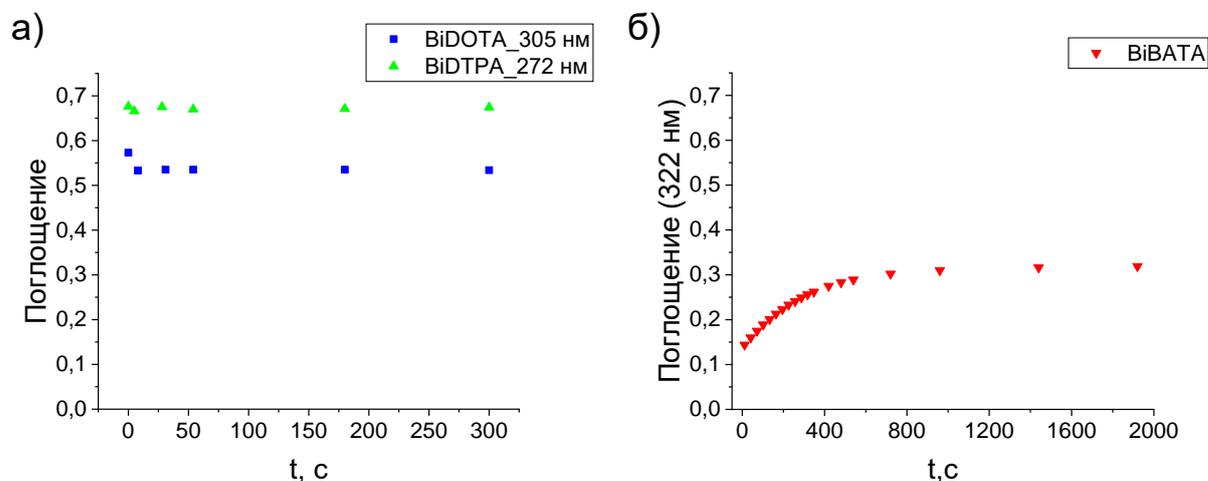


Рисунок 25. Диссоциация комплексов в 0,1 М НСl при 25,0 °С: а) Изменение поглощения пиков комплексов в УФ-спектре комплексов Bi^{3+} с H_4DOTA (305 нм) и H_5DTPA (272 нм) с течением времени; б) Изменение поглощения пика BiCl_4^- (322 нм) в УФ-спектре комплекса Bi^{3+} с $\text{H}_4\text{ВАТА}$ с течением времени.

Можно добавить, что, возможно, константы устойчивости протонированных форм комплекса Bi^{3+} с $\text{H}_4\text{ВАТА}$ действительно могут быть еще выше, что требует дополнительных экспериментов по установлению их значений. Предположительно, из-за большего размера и подвижности молекулы $\text{H}_4\text{ВАТА}$ по сравнению с $\text{H}_4\text{ДОТА}$ миграция протона с ацетатных групп на аминокгруппы лиганда в протонированных формах комплекса $\text{BiH}_n\text{ВАТА}$ происходит быстрее, что приводит к более быстрому протонированию лиганда и высвобождению катиона Bi^{3+} . Предположение о том, что более быстрая диссоциация комплекса Bi^{3+} с $\text{H}_4\text{ВАТА}$ связана именно с протонированными формами лиганда, подтверждается такой же высокой кинетической стабильностью депротонированной формы $[\text{BiВАТА}]^-$ *in vitro* и *in vivo*, как и форма комплекса $[\text{BiДОТА}]^-$.

Однако, для подтверждения данного предположения была более подробно исследована протон-зависимая диссоциация комплекса Bi^{3+} с $\text{H}_4\text{ВАТА}$.

Диссоциацию в кислой среде изучали при 25°C в диапазоне концентраций H^+ 0,01 – 0,30 М. Уравнение (15) использовали для расчета констант скорости первого порядка (k_{obs}), где A_0 , A_e и A_t представляют собой значения оптической плотности, измеренные в начале реакции ($t = 0$), в равновесии и в момент времени t соответственно.

$$A_t = A_e + (A_0 - A_e) \cdot e^{(k_{obs} \cdot t)} \quad (15)$$

В диапазоне от 0,01 М до примерно 0,05 М $[H^+]$ изменение поглощения было очень низким и имело линейный характер (Рисунок П14). В соответствии с уравнением (15) это означает крайне низкие значения констант скорости псевдопервого порядка (k_{obs}). По-видимому, монопротонированная форма комплекса действительно является основной формой в этой области рН и оказывается кинетически инертной. Поэтому при изучении диссоциации комплекса Vi^{3+} с H_4VATA рассматривали более кислую область рН (0,10 – 0,30 М $[H^+]$).

Учитывая, что концентрация комплекса (64 мкМ) значительно ниже, чем концентрация H^+ , реакцию диссоциации можно рассматривать как реакцию псевдопервого порядка, а скорость диссоциации комплекса можно выразить уравнением:

$$-\frac{d[BiL]_t}{dt} = k_{obs}[BiL]_t \quad (16)$$

Где $[BiL]_t$ - общая концентрация комплекса Vi^{3+} .

Общая скорость диссоциации определяется суммой вкладов, даваемых диссоциацией форм комплекса с разной степенью протонирования (уравнение (17)), где k_{Hi} — константа скорости диссоциации, а β_{Hi} — термодинамическая константа устойчивости формы $[ViH_iL]$. Заряды опущены для упрощения:

$$-\frac{d[BiL]_t}{dt} = k_{obs}[BiL]_t = \sum_i' k_{Hi}[BiH_iL] = k_0[BiL] + \sum_i' k_{Hi}\beta_{Hi}[BiL][H]^i \quad (17)$$

Поэтому, принимая во внимание, что максимальное число протонов в комплексе $ViVATA$ может быть равно четырем, уравнение (17) можно преобразовать в уравнение (18):

$$k_{obs} = \frac{{}^i k_{H0} + {}^i k_{H1}\beta_{H1}[H] + {}^i k_{H2}\beta_{H2}[H]^2 + {}^i k_{H3}\beta_{H3}[H]^3 + {}^i k_{H4}\beta_{H4}[H]^4}{1 + \beta_{H1}[H] + \beta_{H2}[H]^2 + \beta_{H3}[H]^3 + \beta_{H4}[H]^4} \quad (18)$$

Комплекс Vi^{3+} с H_4VATA претерпевает несколько стадий протонирования, причем все они происходят выше области рН кинетических измерений. Согласно диаграмме распределения (Рисунок 26) можно предположить, что комплекс существует преимущественно в одной форме - ViH_2L , а менее протонированная форма комплекса практически не представлена в области рН эксперимента (0,10 – 0,30 М $[H^+]$). Это предположение позволяет заключить, что члены с $\beta_{H2}[H]^2$ являются доминирующими в знаменателе для системы $Vi-VATA$, а

другими членами можно пренебречь. Менее протонированные формы комплекса, как правило, менее реакционноспособны, поэтому их вклад в скорость диссоциации пренебрежимо мал и соответствующими членами в числителе можно пренебречь. Таким образом, в числителе учитываются только члены, соответствующие доминирующей форме $[\text{BiH}_2\text{L}]$ и формам с более высокой степенью протонирования (т.е. $[\text{BiH}_3\text{L}]$ и $[\text{BiH}_4\text{L}]$). Тогда выражение скорости реакции можно упростить, и k_{obs} можно выразить как (3):

$${}^Hk_{\text{obs}} = k_{\text{H}0} + k_{\text{H}1} \cdot [\text{H}] + k_{\text{H}2} \cdot [\text{H}]^2 \quad (19)$$

Где $k_{\text{H}0} = {}'k_{\text{H}2}$, $k_{\text{H}1} = K_{\text{H}3} \times {}'k_{\text{H}3}$ и $k_{\text{H}2} = K_{\text{H}4} \times K_{\text{H}3} \times {}'k_{\text{H}4}$

В исследуемой области рН, согласно определенным константам устойчивости, высокопротонированные формы комплекса Bi^{3+} с H_4BATA являются основными (Рисунок 26). Соответствующая константа устойчивости формы $[\text{BiH}_2\text{BATA}]^+$ ($\lg K = 2,6$) была определена методом экстракции (Таблица 4). Константа $k_{\text{H}0}$ соответствует диссоциации формы $[\text{BiH}_2\text{BATA}]^+$ ($k_{\text{H}0} = {}'k_{\text{H}2}$), тогда как $k_{\text{H}1}$ и $k_{\text{H}2}$ соответствуют диссоциации трипротонированных и тетрапротонированных форм соответственно ($k_{\text{H}1} = K_{\text{H}3} \times {}'k_{\text{H}3}$ и $k_{\text{H}2} = K_{\text{H}3} \times K_{\text{H}4} \times {}'k_{\text{H}4}$). Полученная зависимость констант скорости псевдопервого порядка ${}^Hk_{\text{obs}}$ от концентрации протонов хорошо согласуется с уравнением (19) (Рисунок 27), что приводит к следующим значениям констант скорости: $k_{\text{H}0} = (5,7 \pm 1,1) \cdot 10^{-3} [\text{c}^{-1}]$, $k_{\text{H}1} = (5,6 \pm 1,1) \cdot 10^{-2} [\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}]$ и $k_{\text{H}2} = (3,5 \pm 2,9) \cdot 10^{-1} [\text{M}^{-2} \text{c}^{-1}]$.

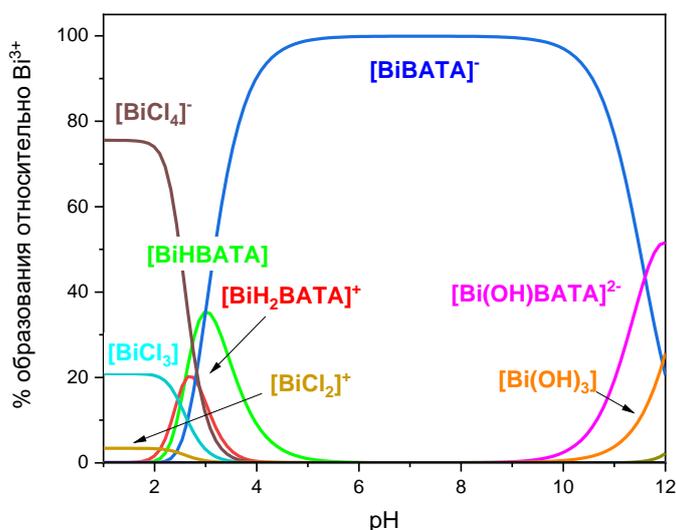


Рисунок 26. Диаграмма распределения форм Bi^{3+} для системы Bi - BATA в условиях исследования кинетики диссоциации комплекса: $c_{\text{L}} = 64 \mu\text{M}$; $c_{\text{Bi}} = 64 \mu\text{M}$; $I = 0,6 \text{ M (K,H)Cl}$.

Интересно, что также наблюдалось очень слабое изменение поглощения вблизи и выше рН 2 (Рисунок П14), которое имело линейную форму, что приводит к очень низким константам скорости псевдопервого порядка, которые не могут быть надежно определены. Это можно объяснить тем, что в растворе начинают присутствовать формы как $[\text{ViHВАТА}]$, так и $[\text{ViВАТА}]^-$. На основании этого можно сделать вывод, что молекула лиганда подвижна и легко протонируется, а при наличии двух и более протонов в комплексе Vi^{3+} с $\text{H}_4\text{ВАТА}$ катион высвобождается из полости макроцикла и комплекс диссоциирует.

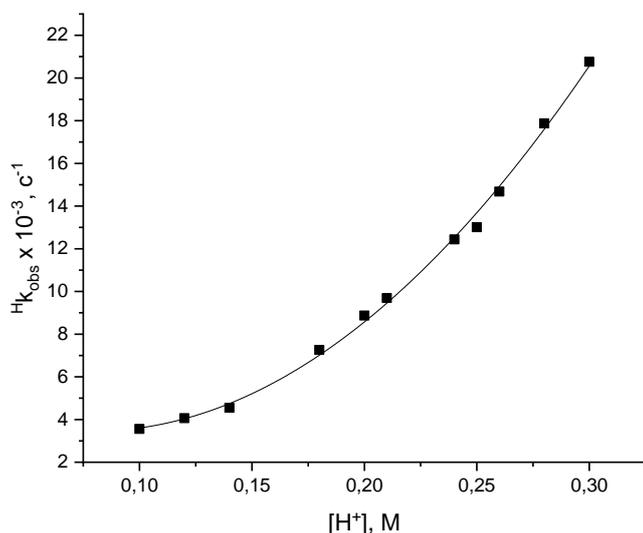


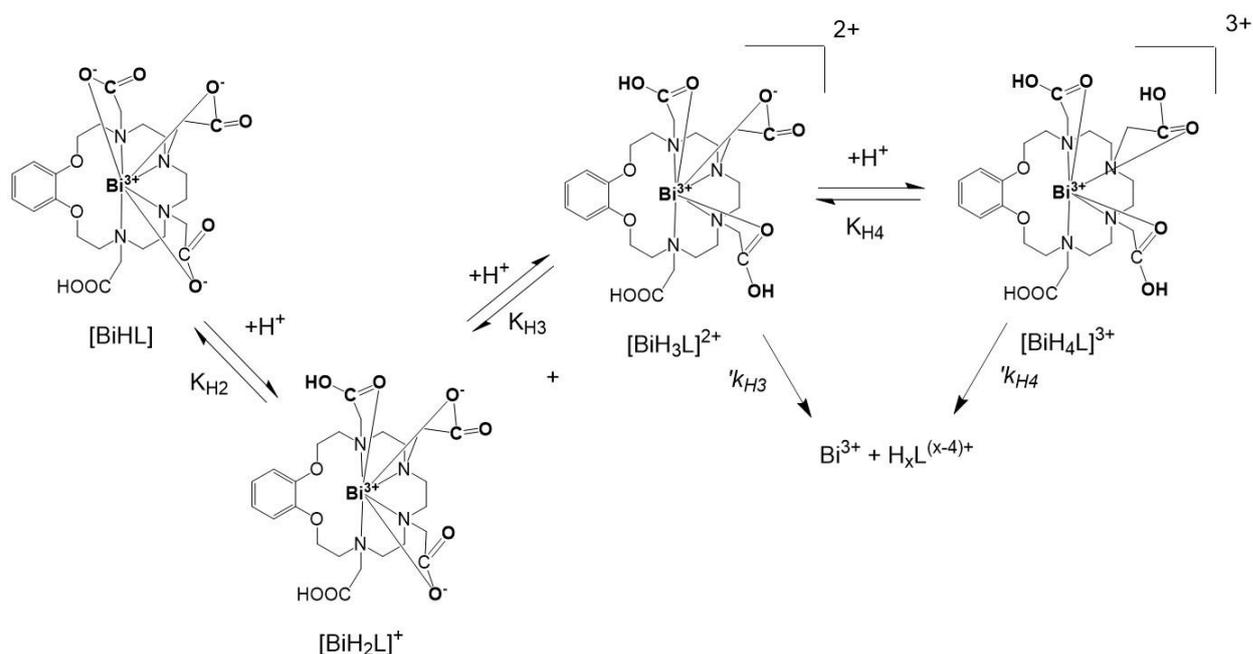
Рисунок 27. Зависимость констант скорости реакции псевдопервого порядка Hk_{obs} от концентрации протонов (25 °С $I = 0,6 \text{ M (K,H)Cl}$).

Согласно кинетическим экспериментам, формы $[\text{ViHВАТА}]$ и $[\text{ViВАТА}]^-$, по-видимому, гораздо более устойчивы к протон-ассоциированной диссоциации по сравнению с $[\text{ViH}_2\text{ВАТА}]^+$ из-за включения Vi^{3+} внутрь полости макроцикла и прочного удерживания катиона атомами азота макроцикла с образованием «внутриклеточного» («in-cage») комплекса. Эта особенность делает комплекс Vi^{3+} с $\text{H}_4\text{ВАТА}$ устойчивым к конкурентному связыванию Vi^{3+} биомолекулами *in vivo*, тогда как Vi^{3+} в комплексе $[\text{ViH}_2\text{ВАТА}]^+$ вытесняется из макроциклической полости протонами и образуется «внеклеточный» («out-of-cage») комплекс, где макроциклические атомы азота легче протонируются.

Согласно проведённому исследованию был предложен механизм кислотной диссоциации комплекса Vi^{3+} с $\text{H}_4\text{ВАТА}$ (схема 2). Первая стадия – быстрое протонирование координирующей Vi^{3+} карбоксильной группы. Следующей определяющей стадией является перенос этого протона от карбоксильной группы к атому азота макроцикла, что в конечном

итоге приводит к диссоциации дважды N-протонированного комплекса. Этот механизм очень похож на комплексы с H_4DOTA и $DOTA$ -подобными лигандами [136][137].

Схема 2. Механизм протон-ассоциированной диссоциации комплекса Bi^{3+} с H_4BATA в 0,10 – 0,30 М $[H^+]$.



* Конкретные места протонирования не уточнены

3.6 Определение кинетической стабильности комплексов H_4BATA с Bi^{3+} и As^{3+} в среде конкурентных катионов и в сыворотке крови

Стабильность *in vitro* [^{207}Bi] $BiBATA$

Для дальнейшей оценки кинетической стабильности комплекса H_4BATA с Bi^{3+} *in vitro* раствор комплекса был приготовлен при комнатной температуре в условиях: 500 мкМ H_4BATA и 50 кБк ^{207}Bi . Стабильность в различных средах определяли методом ТСХ в выбранной ранее системе. Комплекс оставался кинетически инертен в изотоническом растворе (0,9% NaCl) по крайней мере 2 дня (Рисунок 28). Также, комплекс оставался стабилен в присутствии большого избытка катионов микроэлементов Ca^{2+} (5 мМ), Mg^{2+} (5 мМ), Zn^{2+} (0,1 мМ) и Cu^{2+} (0,1 мМ). Показано (Рисунок 28), что комплекс не диссоциирует в присутствии этих катионов по крайней мере в течение 1 сут.

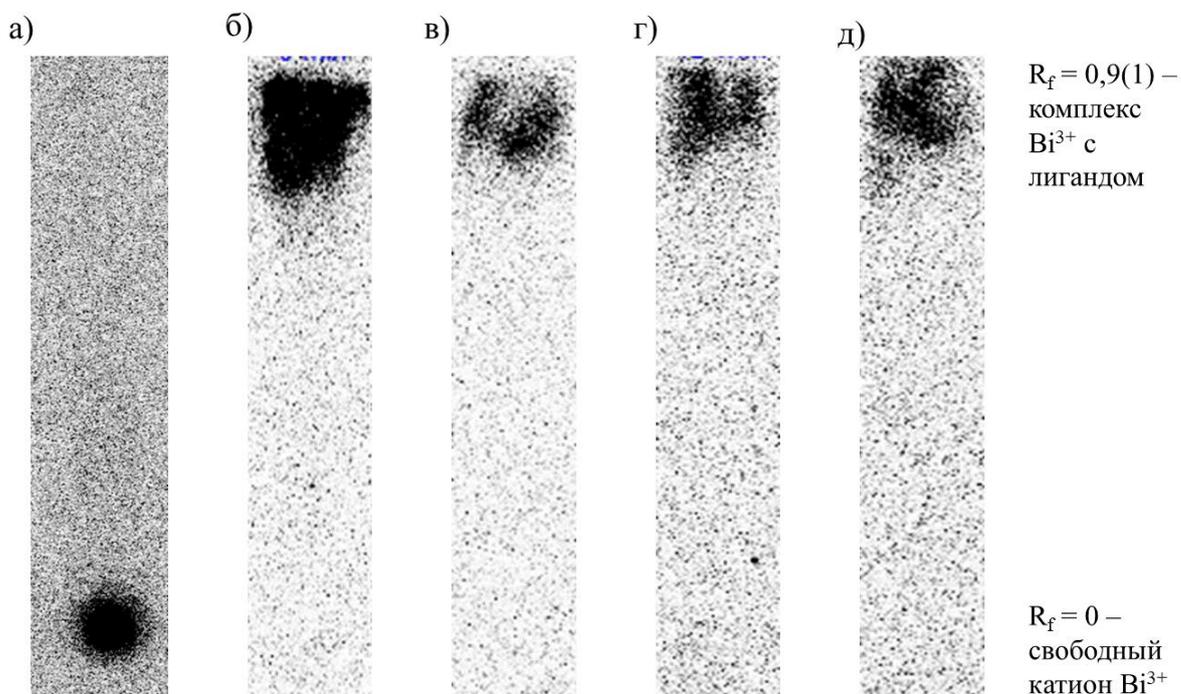


Рисунок 28. Изображения хроматографических пластин после элюирования, полученных методом автордиографии с образцами: а) свободного ^{207}Bi : $R_f = 0$; б) исходный раствор $[\text{}^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}$; в) раствора $[\text{}^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}$ спустя 1 сут в изотоническом растворе; г) раствора $[\text{}^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}$ спустя 1 сут в растворах с Ca^{2+} (5 мМ), Mg^{2+} (5 мМ), Zn^{2+} (0,1 мМ); е) $[\text{}^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}$ спустя 1 сут в растворе с Cu^{2+} (0,1 мМ).

Кинетическую стабильность комплекса Bi^{3+} в 100-кратном избытке эмбриональной бычьей сыворотки крови изучали путем осаждения сывороточных белков и отделения маточного раствора от белковой фракции. Данный простой и экспрессный метод описан в литературе [138]. В течение по крайней мере 2 суток не наблюдалось диссоциации комплекса (Рисунок 29а), что согласуется с полученными высокими значениями pM . Кроме того, для более наглядной оценки полученных результатов были проведены эксперименты по оценке кинетической стабильности в сыворотке крови в тех же условиях с комплексами Bi^{3+} с известными лигандами: с макроциклическим лигандом H_4DOTA , чей комплекс с Bi^{3+} , как известно, обладает высокой инертностью, а также с одним из представителей ациклических лигандов - этилендиаминтетрауксусной кислотой H_4EDTA (Рисунок 29а), которые образуют комплексы лабильные в биологических средах [139][140]. Маточный раствор после осаждения сывороточных белков отбирали на анализ методом ТСХ, и было показано, что в маточном растворе остаётся именно комплекс ($R_f = 0,9$) (Рисунок 29б). Анализ полученных результатов показывают такую же высокую кинетическую стабильность в

сыворотке крови комплекса Bi^{3+} с H_4BATA , как и с H_4DOTA , в отличие от легко диссоциирующего комплекса с H_4EDTA (Рисунок 29а).

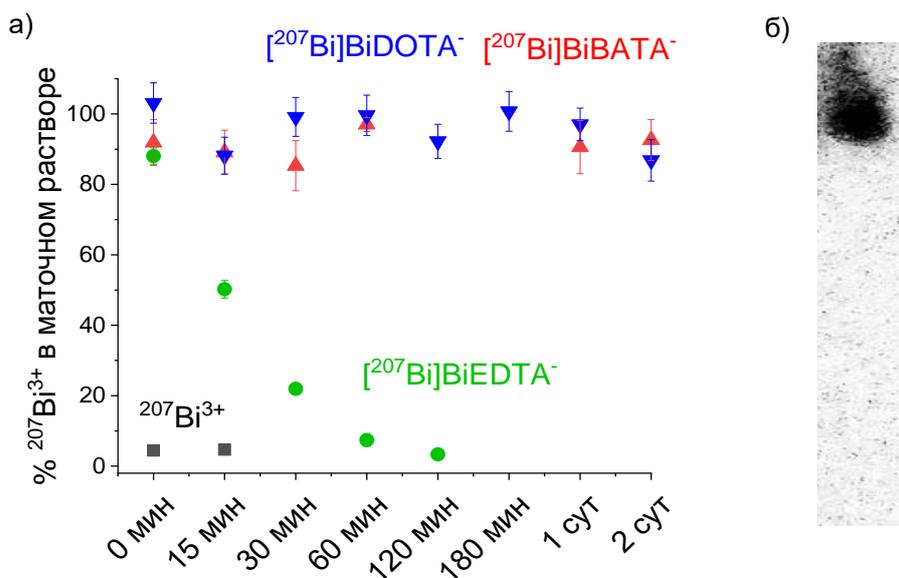


Рисунок 29. а) Доля комплекса Bi^{3+} с лигандами H_4EDTA , H_4DOTA и H_4BATA в присутствии сывороточных белков; б) изображение хроматографической пластины с образцом маточного раствора с $^{207}\text{Bi}^{3+}$ с H_4BATA после 2 сут в сыворотке (95% комплекса).

В литературе приведены данные о стабильности в сыворотке крови комплексов Bi^{3+} с производными H_4DOTA : H_5DEPA (карбоксиметиламино-производное) [58] и $\text{H}_2\text{Me-do2pa}$ (с двумя пиколинатными заместителями вместо четырёх координирующих ацетатных групп) [117]. Было установлено, что комплекс $[\text{Bi}(\text{Me-do2pa})]^+$ был стабилен по крайней мере в течение 2 ч ($\text{РХЧ} > 90\%$ после 2 ч), что соответствует примерно двум периодам полураспада ^{213}Bi , из чего авторы делают вывод о том, что данное производное H_4DOTA подходит для использования в составе РФЛП. Стабильность комплекса с H_5DEPA была исследована в более широком временном диапазоне – 14 сут, и за это время не наблюдалось диссоциации комплекса. Комплекс с лигандом H_4NETA , который структурно близок к H_5DEPA , но обладает меньшим размером макроцикла (9-краун-3) также остаётся стабилен в сыворотке в течение длительного промежутка времени – 265 ч (примерно 11 сут). В литературе также приведены данные о стабильности комплекса Bi^{3+} с ациклическим лигандом с пиколинатными координирующими группами – H_4octapa и его производным $\text{H}_4\text{CHXocrapa}$: комплексы с обоими лигандами были стабильны в течение по крайней мере 1 сут. Таким образом, мы можем сделать вывод, что комплекс с H_4BATA не уступает по стабильности *in vitro* ранее изученным лигандам.

Стабильность *in vitro* [^{228}Ac]AcBATA

Комплексы и конъюгаты с ^{225}Ac , период полураспада которого составляет 10 дней, также должны быть кинетически стабильны в среде организма, чтобы дозовая нагрузка на нормальные ткани была минимальной. В качестве одного из тестов для оценки стабильности *in vitro* применяют определение устойчивости комплекса к связыванию катиона конкурирующими хелатирующими агентами. Обычно для этой цели используют ациклический лиганд - диэтилентриаминпентауксусную кислоту $\text{H}_5\text{ДТРА}$, который быстро связывает катион и обладает высоким термодинамическим сродством к аналогу Ac^{3+} - ионам La^{3+} ($\lg K_{[\text{LaDTPA}]^{2-}} = 19,36$) [141]. Однако в случае комплекса AcBATA данное исследование представляется нецелесообразным из-за высокой скорости комплексообразования H_4BATA , а также более высокой термодинамической устойчивости комплекса ($\lg K_{[\text{AcBATA}]^-} = 26,0$).

Другим способом оценки стабильности комплекса *in vitro* является определение кинетической стабильности комплекса в присутствии избытка конкурирующего иона металла. В случае комплекса AcBATA в качестве конкурента можно использовать ион La^{3+} в связи с установленным высоким сродством H_4BATA к этому иону металла (Таблица 4). Для этого к раствору, содержащему H_4BATA (50 мкМ) и [^{228}Ac]Ac(NO_3)₃ (3 кБк), добавляли 50-кратный избыток La^{3+} относительно концентрации лиганда и более чем 10^9 -кратный избыток относительно концентрации Ac^{3+} при комнатной температуре (радиохимическая чистота комплекса [^{228}Ac]AcBATA составляла 96%). Через заданные временные интервалы отбирали аликвоты раствора и проводили анализ методом ТСХ в выбранной ранее системе (пластина с целлюлозой на алюминиевой подложке и элюент на основе 0,9% раствора NaCl и 10 мМ NaOH). В течение по крайней мере выдержки в течение 1 сут с избытком La^{3+} не наблюдали изменения содержания комплекса [^{228}Ac]AcBATA (Рисунок 30), что свидетельствует о значительной устойчивости комплекса к перехелатированию конкурирующими ионами металла.

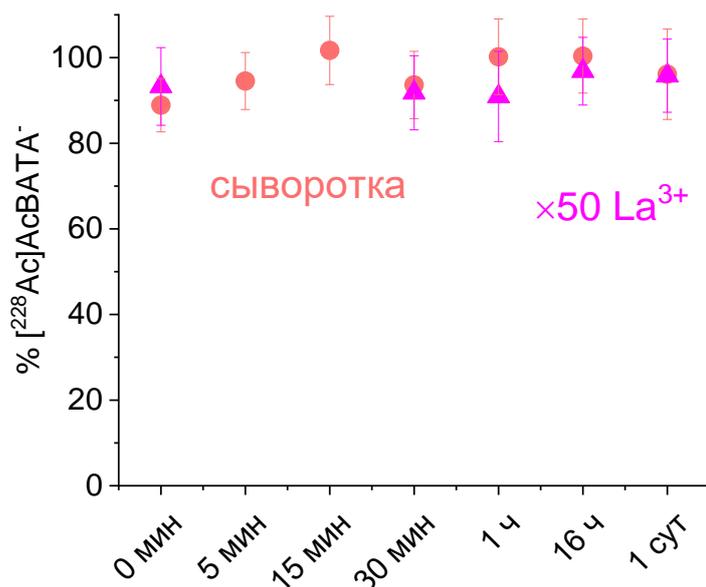


Рисунок 30. Изменение РХЧ комплекса $[^{228}\text{Ac}]\text{AcBATA}$ с течением времени в среде конкурирующих ионов La^{3+} (50-кратный избыток относительно концентрации лиганда) и сывороточных белков (10-кратный избыток сыворотки по объёму).

Для оценки стабильности комплекса AcBATA в среде эмбриональной бычьей сыворотки приготовили раствор комплекса $[^{228}\text{Ac}]\text{AcBATA}$ (радиохимическая чистота составила 95% по данным ТСХ) и смешали с 10-кратным избытком по объёму эмбриональной бычьей сыворотки. Образец выдерживали при 37°C . Через равные промежутки времени отбирали аликвоты образца, осаждали сывороточные белки и отделяли маточный раствор, содержащий комплекс. На Рисунок 30 показано изменение содержания комплекса Ac^{3+} с H_4BATA в сыворотке крови в течение 1 сут. Из полученных данных можно сделать вывод, что комплекс H_4BATA с Ac^{3+} оказывается кинетически стабилен в сыворотке крови по крайней мере в течение 1 сут, что указывает на такую же высокую стабильность комплекса $[\text{AcBATA}]^-$, как и $[\text{AcDOTA}]^-$ и $[\text{Ac}(\text{macro})]^+$ [134], а также $[\text{Ac}(\text{py4pa})]^-$ [63] за этот период времени. Предположительно, такое эффективное экранирование катиона от конкурирующих агентов обеспечивается за счёт включения Ac^{3+} внутрь макроцикла, сопровождаемое координацией всех четырех ацетатных «рук» с обеих сторон полости макроцикла, образуя, таким образом, окружение с высоким КЧ в соответствии с данными DFT для комплекса LaBATA .

3.7 Исследование биораспределения комплексов Bi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA в организме здоровых мышей

Биораспределение $^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}^-$

Перед конъюгированием лиганда с биологическим вектором следует предварительно оценить кинетическую стабильность радиоактивного комплекса с лигандом *in vivo*. В случае диссоциации комплекса в среде организма, нет необходимости в дальнейшем связывании лиганда с биомолекулой. Высокая скорость образования комплексов Bi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA уже при комнатной температуре, продемонстрировавших высокую термодинамическую устойчивость и кинетическую стабильность *in vitro*, позволяют перейти к этапу исследования поведения комплексов в организме здоровых мышей.

Внутрибрюшинно вводили 100 мкл комплекса с радиоактивной меткой ^{207}Bi (рН 6,1, 0,01 М буфер MES). Мышей подвергали эвтаназии через 1 и 6 часов. Собирали кровь и основные органы, взвешивали и измеряли радиоактивность методом гамма-спектрометрии (с HPGe-детектором GR3818 Canberra Ind.). Для каждой ткани определяли процент вводимой дозы на грамм (%введ.д./г). Среднее значение и стандартное отклонение для каждого органа представлено в Таблица 8. Видно, что комплекс Bi^{3+} с H_4BATA обладает тем же профилем биораспределения и так же быстро выводится из организма, как и комплекс с H_4DOTA . Максимальное накопление ^{207}Bi среди всех тканей наблюдали в почках: оно составило 3,03 % введ.д./г, и это значение снижалось до 1,97 % введ.д./г спустя 6 часов. Данный факт свидетельствует о преимущественном выведении комплекса посредством почек. Через 6 ч не наблюдалось накопления в других биологических тканях: в печени было определено лишь 0,1% введ.д./г, а в остальных органах – ещё меньшие значения. Более того, накопление ^{207}Bi при введении как $^{207}\text{Bi}]\text{BiDOTA}^-$, так и $^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}^-$ в некоторых биологических тканях не превышало минимально определяемого уровня активности, поэтому количественно оценить накопление не представлялось возможным. По сравнению с результатами, полученными для $^{207}\text{Bi}]\text{BiEDTA}^-$, который, как было показано в эксперименте с сывороточными белками, лабилен в биологических средах (что видно по высокому накоплению ^{207}Bi во всём теле и, особенно, в почках) $^{207}\text{Bi}]\text{BiBATA}^-$ демонстрирует другой профиль биораспределения и столь же высокую инертность *in vivo*, как и комплекс с «золотым стандартом» в ядерной медицине H_4DOTA .

В литературе также представлены данные о стабильности *in vivo* комплекса Bi^{3+} с H_5DEPA (18-краун-6) [58], производным H_4DOTA , а также комплекса с H_4NETA (9-краун-3) [130].

Накопление во всех органах, в случае комплекса с H₅DEPA, такое же низкое, как и в случае комплексов с H₄BATA и H₄DOTA, уже спустя 1 ч (1 % введ.д./г), что говорит о быстром выведении стабильного комплекса из организма, в отличие от комплекса с H₄NETA, у которого наблюдалось накопление в печени (6,18 % введ.д./г) через 1 ч, которое практически не уменьшалось с течением времени, хотя предварительный эксперимент по оценке стабильности комплекса в сыворотке крови показал его инертность в течение 11 сут. Это говорит о том, что, предположительно, для крупного трёхзарядного катиона Bi³⁺ больше подходят макроциклические лиганды с бóльшим размером макроцикла.

Таблица 8. Распределение (% введ.д./г) комплексов [²⁰⁷Bi]BiEDTA⁻, [²⁰⁷Bi]BiDOTA⁻ и [²⁰⁷Bi]BiBATA⁻ в организме здоровых мышей (n = 3 для каждой точки).

	[²⁰⁷ Bi]BiEDTA ⁻		[²⁰⁷ Bi]BiDOTA ⁻		[²⁰⁷ Bi]BiBATA ⁻	
	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч
Печень	6 ± 2	2,30 ± 0,80	0,18 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,40 ± 0,29	0,11 ± 0,02
Почки	45 ± 1	17,6 ± 3,2	1,83 ± 0,42	1,10 ± 0,23	3,03 ± 0,52	1,97 ± 0,14
Бедр. кость	-	-	0,97 ± 0,60	0,14 ± 0,07	0,58 ± 0,23	0,07 ± 0,01
Селезёнка	0,20 ± 0,08	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,19 ± 0,13	0,08 ± 0,02
Лёгкие	0,30 ± 0,10	0,149 ± 0,002	0,16 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,22 ± 0,13	0,06 ± 0,01
Сердце	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,01	-	0,10 ± 0,08	0,02 ± 0,01
Кровь	-	-	-	-	1,14 ± 0,63	-
Мозг	0,020 ± 0,002	0,014 ± 0,005	0,05 ± 0,01	-	0,02 ± 0,01	-
Остальное тело	22 ± 6	29 ± 2	0,47 ± 0,09	0,15 ± 0,01	1,1 ± 0,5	0,25 ± 0,06

* «-» - радиоактивность ниже уровня детектирования

Биораспределение $[^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$

Биораспределение ^{225}Ac в форме ацетата, представленное в литературе, указывает на то, что через 4 часа максимальное накопление свободного ^{225}Ac происходит в печени. Некоторое накопление также наблюдается в почках, сердце и костях. Поглощение ацетата актиния в печени и костях со временем увеличивалось, а также в целом наблюдался медленный клиренс [40]. Следовательно, диссоциация комплекса с ^{225}Ac *in vivo* будет влиять на значения % вв.д./г так, что они будут снижаться крайне медленно с течением времени и увеличиваться в некоторых тканях. Ион Ac^{3+} , введенный в виде нитрата ($[^{227}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$), вел себя аналогично ацетату с основным накоплением радиоактивности в печени и организме в целом спустя почти 7 ч [142]. Тот же профиль биораспределения сохраняется и для La^{3+} ($[^{140}\text{La}]\text{LaCl}_3$), который является аналогом Ac^{3+} в ряду лантаноидов [143]. Однако некоторые авторы также сообщают об одинаково высоком накоплении свободного ^{225}Ac как в селезенке, так и в печени [56]. В текущей работе было отдельно исследовано биораспределение $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$, в ходе которого наблюдали наибольшее накопление в печени и в месте инъекции (хвост), а также некоторое накопление во всех органах (Таблица 9). Накопление ^{225}Ac в селезенке было меньше, чем в печени, и составило всего 2% вв.д./г, что хорошо согласуется с литературными данными [40, 142, 143]. Следовательно, при диссоциации комплекса с ^{225}Ac следует ожидать тот же профиль биораспределения с преимущественным накоплением в печени и значительном накоплении ^{225}Ac в остальных органах, а также медленным клиренсом.

Таблица 9. Распределение (% введ.д./г) $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ и $[^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$ в выбранных органах здоровых самцов мышей линии C57bl/6 спустя 6 ч после внутривенного введения. Радиоактивность ^{225}Ac измеряли по ^{213}Bi (440 кэВ), который находится в радиоактивном равновесии с материнским радионуклидом ^{225}Ac .

	$[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$	$[^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$
Печень	53±16%	0,20±0,18%
Почки	14,4±4,7%	0,39±0,31%
Бедр. кость	9,0±3,9%	0,45±0,45%
Селезёнка	2,1±1,7%	0,22±0,20%
Лёгкие	3,2±1,9%	0,01±0,03%
Сердце	6,5±4,9%	0,07±0,02%
Кровь	1,2±1,2%	0,09±0,09%
Мозг	0,13±0,03%	0,003±0,002%
Поджелудочная железа	1,7±0,4%	0,04±0,03%
Хвост	59±17%	1,13±0,35%
Моча	26±23%	2,9±2,7%
Остальное тело	5,1±3,8%	0,39±0,39%

Для корректного определения содержания ^{225}Ac в органах мы измеряли радиоактивность каждой ткани через 7 часов после эвтаназии, когда достигалось вековое равновесие между ^{225}Ac , ^{221}Fr и ^{213}Bi . Радиоактивность ^{225}Ac в органах определяли методом гамма-спектрометрии по гамма-излучению как ^{221}Fr , так и ^{213}Bi . Между этими данными не было принципиальных отличий, поэтому результаты биораспределения (Таблица 9) представлены с использованием данных, полученных в результате измерения радиоактивности ^{213}Bi (440 кэВ).

Профиль биораспределения $[^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$ значительно отличается от профиля $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$. Во-первых, наблюдается крайне низкий % вв.д./г во всех органах, в том числе в печени (0,2 % вв.д./г), в которой наблюдалось наибольшее накопление ^{225}Ac в случае нитратной формы. Следовательно, комплекс $[^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$ не высвобождает свободный $^{225}\text{Ac}^{3+}$ *in vivo* и остаётся инертен. Во-вторых, согласно профилю выведения ^{225}Ac при инъекции в виде $[^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$, полученному с применением метаболической камеры (Таблица 10), ^{225}Ac практически полностью выводится из организма через 6 ч с мочой.

Таблица 10. Распределение ^{225}Ac в экскрементах после внутривенного введения $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$.

	Время после инъекции			
	116 мин	195 мин	296 мин	375 мин
Моча, % введ.д.	-	$2,5 \pm 0,5$	33 ± 4	$0,12 \pm 0,06$
Фекалии, % введ.д.	$0,06 \pm 0,06$	-	$2,4 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,3$

Таким образом, выведение ^{225}Ac из организма осуществлялось в основном почками, что свидетельствует о выведении ^{225}Ac именно в форме комплекса $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$. Профиль биораспределения аналогичен профилю $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcDOTA}^-$ [56]. Накопление в почках в случае комплекса $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$ ($0,39 \pm 0,31$ % (6 ч)) было столь же низким, как и в случае $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcDOTA}^-$ ($0,6172 \pm 0,0168$ % (5 ч) [56] или $0,80 \pm 0,23$ % (4 ч) [40]). Также видно, что накопление в почках было несколько ниже, чем в случае комплекса $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{масгора})^+$ ($0,74 \pm 0,06$ % (5 ч) [56]). Сравнения распределение комплекса $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$ в других органах с распределением $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcDOTA}^-$ и $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{масгора})^+$ [56], мы видим крайне низкое накопление ^{225}Ac во всех органах (кроме мочевого пузыря за счет почечной экскреции) для всех трёх комплексов, из чего можем заключить, что комплекс $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$ демонстрирует такую же высокую стабильность *in vivo*, как и комплексы $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcDOTA}^-$ и $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{Ac}(\text{масгора})$. Биораспределение комплекса Ac^{3+} с лигандом H_6HENA , размер макроцикла которого такой же, как у H_4BATA (18-краун-6), также практически не отличается от распределения комплекс $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$, но наблюдается несколько более высокое накопление в почках ($0,71 \pm 0,05$ % (4 ч) [40]). В случае комплекса $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcPEPA}^{2-}$ (макроцикла 15-краун-5) накопление во всех органах, включая почки, печень, сердце и кости, было значительно выше, что указывает на гораздо меньшую стабильность комплекса. Кроме того, $[\text{}^{225}\text{Ac}]\text{AcBATA}^-$ демонстрирует гораздо более высокую стабильность, чем комплексы с линейными полиаминокарбоксилатами, которые, несмотря на быстрое комплексообразование, вероятно, не являются подходящими лигандами для связывания Ac^{3+} [40].

Таким образом, комплекс $[\text{AcBATA}]^-$ по меньшей мере столь же инертен в организме, как и $[\text{AcDOTA}]^-$, а также $\text{Ac}[\text{масгора}]^+$ и $[\text{AcHENA}]^-$, которые обладают таким же размером макроцикла 18-краун-6, который, по-видимому, более предпочтителен для трёхзарядного катиона с таким высоким ионным радиусом, как Ac^{3+} .

Выводы

1. Комплекс $[\text{BiBATA}]^-$ не уступает, а $[\text{AcBATA}]^-$ превосходит соответствующие комплексы с H_4DOTA по термодинамическим параметрам, поскольку размер макроцикла 18-краун-6 более предпочтителен для таких крупных катионов как Bi^{3+} и Ac^{3+} для образования устойчивого внутрисферного комплекса;
2. Показано, что комплексы Bi^{3+} и Ac^{3+} с H_4BATA образуются уже при комнатной температуре (25°C) с высокой скоростью (в течение 1-3 мин), что обусловлено подвижностью структуры макроцикла 18-краун-6;
3. Установлено, что лиганд H_4BATA быстро связывает катион Bi^{3+} даже при низких значениях pH ($\text{pH} < 1$) уже при комнатной температуре аналогично H_5DTPA . В то же время, комплекс легко протонируется из-за высокого сродства протонов к лиганду H_4BATA по механизму, схожему с H_4DOTA и её аналогами;
4. Высокая кинетическая стабильность комплекса Bi^{3+} с H_4BATA обусловлена высокой кинетической инертностью форм $[\text{BiBATA}]^-$ и $[\text{BiHBATA}]$, являющимися основными формами при $\text{pH} > 2$.
5. Показано, что комплексы $[\text{BiBATA}]^-$ и $[\text{AcBATA}]^-$ характеризуются как высокой термодинамической устойчивостью, так и кинетической инертностью в организме, что отражается в быстром выведении и отсутствии накопления в органах.

Список литературы

- Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA): [сайт]. URL: <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/drug-approvals-and-databases>.
2. Кодина Г.Е., Красикова Р.Н. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины: учеб. пособие для вузов. Москва: Издательский дом “МЭИ,” 2014. 281 р.
 3. Баранов В.Ю. Изотопы: свойства, получение, применение. Том 1. Москва: "Физматлит", 2005. 552 р.
 4. Kassis A.I. The amazing world of Auger electrons // International Journal of Radiation Biology. 2004. № 11–12(80). С. 789–803.
 5. Sgouros G. et al. Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges // Nature Reviews Drug Discovery. 2020. № September(19). С. 589–608.
 6. Poty S. et al. α -emitters for radiotherapy: From basic radiochemistry to clinical studies — part 1 // Journal of Nuclear Medicine. 2018. № 6(59). С. 878–884.
 7. Kassis A.I. Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles // Seminars in Nuclear Medicine. 2008. № 5(38). С. 358–366.
 8. Cadart C. et al. The physics of cell-size regulation across timescales // Nature Physics. 2019. № 10(15). С. 993–1004.
 9. Chan P.C. et al. The Radiotoxicity of Iodine-125 in Mammalian Cells // Radiation Research. 1976. № 2(67). С. 332–343.
 10. Karyagina T.S. et al. Targeted Delivery of ^{111}In Into the Nuclei of EGFR Overexpressing Cells via Modular Nanotransporters With Anti-EGFR Affibody // Frontiers in Pharmacology. 2020. № March(11). С. 1–15.
 11. Humm J.L., Cobb L.M. Nonuniformity of tumor dose in radioimmunotherapy // Journal of Nuclear Medicine. 1990. № 1(31). С. 75–83.
 12. Nelson B.J.B., Andersson J.D., Wuest F. Targeted alpha therapy: Progress in radionuclide production, radiochemistry and applications // Pharmaceutics. 2021. № 1(13). С. 1–28.
 13. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov: [сайт]. URL:

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=alpharadin&cond=%22Prostatic+Neoplasms%22>.
14. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov: [сайт]. URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT03128034?V_5=View.
 15. Rosenblat T.L. et al. Sequential Cytarabine and α -Particle Immunotherapy with Bismuth-213-Lintuzumab (HuM195) for Acute Myeloid Leukemia // *Clinical Cancer Research*. 2010. № 21(16). С. 5303–5311.
 16. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov: [сайт]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00672165?term=213Bi&draw=2&rank=1>.
 17. Morgenstern A., Bruchertseifer F., Apostolidis C. Bismuth-213 and actinium-225–generator performance and evolving therapeutic applications of two generator-derived alpha-emitting radioisotopes // *Current Radiopharmaceuticals*. 2012. № 3(5). С. 221–227.
 18. Ermolaev S., Skasyrskaya A., Vasiliev A. A Radionuclide Generator of High-Purity Bi-213 for Instant Labeling // *Pharmaceutics*. 2021. № 6(13). С. 1–18.
 19. Vasiliev A.N. et al. Radiation Stability of Sorbents in Medical Ac/Bi Generators // *Solvent Extraction and Ion Exchange*. 2020. № 4(39). С. 1–20.
 20. Robertson A.K.H. et al. Development of Experiences ^{225}Ac Radiopharmaceuticals: TRIUMF Perspectives and Experiences // *Current Radiopharmaceuticals*. 2018. № 3(11). С. 156–172.
 21. Griswold J.R. et al. Large scale accelerator production of ^{225}Ac : Effective cross sections for 78-192MeV protons incident on ^{232}Th targets // *Applied Radiation and Isotopes*. 2016. (118). С. 366–374.
 22. Apostolidis C. et al. Cyclotron production of Ac-225 for targeted alpha therapy // *Applied Radiation and Isotopes*. 2005. № 3(62). С. 383–387.
 23. Sollini M. et al. The five “W”s and “How” of Targeted Alpha Therapy: Why? Who? What? Where? When? and How? // *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*. 2020. (31). С. 231–247.
 24. Cordier D. et al. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally substance P: a pilot trial // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2010. № 7(37). С. 1335–1344.

25. Królicki L. et al. Safety and efficacy of targeted alpha therapy with ^{213}Bi -DOTA-substance P in recurrent glioblastoma // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2018. № 3(46). C. 614–622.
26. Królicki L. et al. Dose escalation study of targeted alpha therapy with [^{225}Ac]Ac-DOTA-substance P in recurrence glioblastoma – safety and efficacy // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2021. № 11(48). C. 3595–3605.
27. FDA Letter of Approval for LUTATHERA: [сайт]. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2018/208700Orig1s000ltr.pdf.
28. FDA Letter of Approval for PLUVICTO: [сайт]. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/215833s000lbl.pdf.
29. Bodei L., Kwekkeboom D.J., Kidd M. Radiolabeled Somatostatin Analogue Therapy Of Gastroenteropancreatic Cancer // *Seminars in Nuclear Medicine*. 2016. № 3(46). C. 225–238.
30. Kratochwil C. et al. ^{213}Bi -DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2014. № 11(41). C. 2106–2119.
31. Kratochwil C. et al. Targeted α -Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with ^{225}Ac -PSMA-617: Swimmer-Plot Analysis Suggests Efficacy Regarding Duration of Tumor Control // *Journal of Nuclear Medicine*. 2018. № 5(59). C. 795–802.
32. Sathekge M.M. et al. Global experience with PSMA - based alpha therapy in prostate cancer // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2021. № 1(49). C. 30–46. DOI:10.1007/s00259-021-05434-9.
33. Hooijman E.L. et al. Development of [^{225}Ac]Ac-PSMA-I&T for Targeted Alpha Therapy According to GMP Guidelines for Treatment of mCRPC // *Pharmaceutics*. 2021. № 5(13). C. 715.
34. Kratochwil C. et al. Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer // *Journal of Nuclear Medicine*. 2016. № 12(57). C. 1941–1944.
35. Price E.W., Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals // *Chemical Society reviews*. 2014. № 1(43). C. 260–90.

36. Beyer G.-J. et al. Targeted alpha therapy *in vivo*: direct evidence for single cancer cell kill using ^{149}Tb -rituximab // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2004. № 4(31). C. 547–554.
37. Taylor A.T. Radionuclides in Nephrourology, Part 1: Radiopharmaceuticals, Quality Control, and Quantitative Indices // Journal of Nuclear Medicine. 2014. № 4(55). C. 608–615.
38. Królicki L. et al. Safety and efficacy of targeted alpha therapy with ^{213}Bi -DOTA-substance P in recurrent glioblastoma // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2018. № 3(46). C. 614–622.
39. Zhang J. et al. Safety, Pharmacokinetics, and Dosimetry of a Long-Acting Radiolabeled Somatostatin Analog ^{177}Lu -DOTA-EB-TATE in Patients with Advanced Metastatic Neuroendocrine Tumors // Journal of Nuclear Medicine. 2018. № 11(59). C. 1699–1705.
40. Deal K.A. et al. Improved *in vivo* stability of actinium-225 macrocyclic complexes // Journal of Medicinal Chemistry. 1999. № 15(42). C. 2988–2992.
41. Dai L. et al. biomedical imaging and therapy applications // Nature Communications. № 1(9). 2018. C. 1–10.
42. Tircsó G. et al. Comparison of the equilibrium, kinetic and water exchange properties of some metal ion-DOTA and DOTA-bis (amide) complexes // Journal of Inorganic Biochemistry. 2020. (206). C. 111042.
43. Regueiro-figueroa M. et al. Highly Stable Complexes of Divalent Metal Ions (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Pb^{2+}) with a DOTA-Like Ligand Containing a Picolinate Pendant // European Journal of Inorganic Chemistry. 2014. № 36(2014). C. 6165–6173.
44. Lubal P. et al. Formation and decomplexation kinetics of copper(II) complexes with cyclen derivatives having mixed carboxylate and phosphonate pendant arms // Dalton Transactions. 2016. № 32(45). C. 12723–12733.
45. Voráčová I. et al. Dissociation kinetics study of copper(II) complexes of DO3A, DOTA and its monosubstituted derivatives // Polyhedron. 2013. (61). C. 99–104.
46. Urbanovský P. et al. The Solid-State Structures and Ligand Cavity Evaluation of Lanthanide(III) Complexes of DOTA Analogue with a (Dibenzylamino)methylphosphinate Pendant Arm // Dalton Transactions. 2020. № 5(49). C. 1555–1569.

47. Urbanovsky P. et al. Lanthanide Complexes of DO3A – (Dibenzylamino)methylphosphinate: Effect of Protonation of the Dibenzylamino Group on the Water-Exchange Rate and the Binding of Human Serum Albumin // *Inorganic Chemistry*. 2019. № 8(58). C. 5196–5210.
48. Bárta J. et al. Coordination Behavior of 1,4-Disubstituted Cyclen Endowed with Phosphonate, Phosphonate Monoethylester, and H-Phosphinate Pendant Arms // *Molecules*. № 18(24). 2019. C. 3324.
49. Lima L.M.P. et al. Investigating the Complexation of the Pb²⁺/Bi³⁺ Pair with Dipicolinate Cyclen Ligands // *Inorganic Chemistry*. 2015. № 14(54). C. 7045–7057.
50. Kubíček V. et al. NOTA Complexes with Copper(II) and Divalent Metal Ions: Kinetic and Thermodynamic Studies // *Inorganic Chemistry*. 2018. № 6(57). C. 3061–3072.
51. Taylor P. et al. Stability constants of metal complexes of macrocyclic ligands with pendant donor groups // *Supramolecular Chemistry*. 1996. № 3–4(6). C. 37–41.
52. Brett A.V. et al. Chelation with a twist: a bifunctional chelator to enable room temperature radiolabeling and targeted PET imaging with scandium-44 // *Chemistry Science*. 2020. № 2(11). C. 333–342.
53. Hirsch W., Greenman J., Pizer R. Complexation of aqueous iodine by 18-crown-6 // *Canadian Journal of Chemistry*. 1993. № 12(71). C. 2171–2174.
54. Chappell L.L. et al. Synthesis, conjugation, and radiolabeling of a novel bifunctional chelating agent for ²²⁵Ac radioimmunotherapy applications // *Bioconjugate Chemistry*. 2000. № 4(11). C. 510–519.
55. Miao L. et al. Design and synthesis of an “ultrachelating” ligand based on an 18-membered ring hexaaza macrocycle // *Supramolecular Chemistry*. 1996. № 3–4(6). C. 365–373.
56. Thiele A.N.A. et al. An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy // *Angewandte Chemie*. 2017. № 46(56). C. 14712–14717.
57. Abou D.S. et al. Towards the stable chelation of radium for biomedical applications with an 18-membered macrocyclic ligand // *Chemical Science*. 2021. № 10(12). C. 3733–3742.
58. Chong H.S. et al. Synthesis and biological evaluation of a novel decadentate ligand DEPA // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2008. № 21(18). C. 5792–5795.

59. Kang C.S. et al. Synthesis and preclinical evaluation of bifunctional ligands for improved chelation chemistry of ^{90}Y and ^{177}Lu for targeted radioimmunotherapy // *Bioconjugate Chemistry*. 2012. № 9(23). C. 1775–1782.
60. Kálmán F.K. et al. H_4octapa : Highly stable complexation of lanthanide(III) ions and copper(II) // *Inorganic Chemistry*. 2015. № 5(54). C. 2345–2356.
61. Lucio-Martínez F. et al. Rigid H_4OCTAPA derivatives as model chelators for the development of Bi(III)-based radiopharmaceuticals // *Chemical Communications*. 2023. № 23(59). C. 3443–3446.
62. Ingham A. et al. H_2ampa -Versatile Chelator for $^{203}\text{Pb}[\text{Pb}]^{2+}$, $^{213}\text{Bi}[\text{Bi}]^{3+}$, and $^{225}\text{Ac}[\text{Ac}]^{3+}$ // *Inorganic Chemistry*. 2022. № 24(61). C. 9119–9137.
63. Li L. et al. ^{225}Ac - $\text{H}_4\text{py4pa}$ for Targeted Alpha Therapy // *Bioconjugate Chemistry*. 2021. № 7(32). C. 1348–1363.
64. Spreckelmeyer S. et al. $\text{P-NO}_2\text{-Bn-H}_4\text{neunpa}$ and $\text{H}_4\text{neunpa-Trastuzumab}$: Bifunctional Chelator for Radiometal pharmaceuticals and ^{111}In Immuno-Single Photon Emission Computed Tomography Imaging // *Bioconjugate Chemistry*. 2017. № 8(28). C. 2145–2159.
65. Wharton L. et al. $^{213}\text{Bi}[\text{Bi}]^{3+}/^{111}\text{In}[\text{In}]^{3+}$ -neunpa-cycMSH: Theranostic Radiopharmaceutical Targeting Melanoma - Structural, Radiochemical, and Biological Evaluation // *Bioconjugate Chem*. 2022. № 3(33). C. 505–522.
66. Nancollas G.H. and Tomson M.B. Guidelines for the determination of stability constants // *Pure and Applied Chemistry*. 1982. № 12(54). C. 2675–2692.
67. Bevilacqua A. et al. Equilibrium and Thermodynamic Study of the Aqueous Complexation of 1,4,7-Triazacyclononane- $\text{N,N}'$, N'' -triacetic Acid with Protons, Alkaline-Earth-Metal Cations, And Copper(II) // *Inorganic Chemistry*. 1987. № 16(26). C. 2699–2706.
68. Clarke E.T. and Martell A.E. Stabilities of the Fe(III), Ga(III) and In(III) chelates of $\text{N,N}',\text{N}''$ -triazacyclononanetriacetic acid // *Inorganica Chimica Acta*. 1991. № 2(181). C. 273–280.
69. Försterová M. et al. Thermodynamic study of lanthanide(III) complexes with bifunctional monophosphinic acid analogues of H_4dota and comparative kinetic study of yttrium(III) complexes // *Dalton Transactions*. 2006. № 5. C. 535–549.

70. Csajbo É. et al. Equilibrium, ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy, and X-ray Diffraction Studies on the Complexes $\text{Bi}(\text{DOTA})^-$ and $\text{Bi}(\text{DO3A-Bu})$ // *Inorganic Chemistry*. 2003. № 7(42). С. 2342–2349.
71. Kannengießer S. Optimization of the Synthesis of Ac-225-labelled DOTA-Radioimmunoconjugates for Targeted Alpha Therapy based on Investigations on the Complexation of Trivalent Actinides by DOTA // Диссертация. Гейдельбергский Университет. Германия. 2013.
72. Pniok M. et al. Thermodynamic and kinetic study of scandium(III) complexes of DTPA and DOTA: A step toward scandium radiopharmaceuticals // *Chemistry - A European Journal*. 2014. № 26(20). С. 7944–7955.
73. Jurkin D., Gildehaus F.J., Wierczinski B. Dissociation kinetics determination of yttrium(III)-polyaminocarboxylates using free-ion selective radiotracer extraction (FISRE) // *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2009. № 2(52). С. 33–40.
74. Ma J. et al. Efficacy and Safety of ^{225}Ac -PSMA-617-Targeted Alpha Therapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Frontiers in Oncology*. 2022. № February(12). С. 796657.
75. Hooijman E.L. et al. Development of [^{225}Ac]Ac-PSMA-I&T for Targeted Alpha Therapy According to GMP Guidelines for Treatment of mCRPC // *Pharmaceutics*. 2021. № 5(13). С. 715.
76. Yadav M.P. et al. Efficacy and safety of ^{225}Ac -PSMA-617 targeted alpha therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer patients // *Theranostics*. 2020. № 20(10). С. 9364–9377.
77. Adamson A.W. Advanced Inorganic Chemistry // *Inorganic Chemistry*. 1963. № 3(2). С. 665.
78. Anderegg G. et al. Critical evaluation of stability constants of metal complexes of complexones for biomedical and environmental applications (IUPAC Technical Report) // *Pure and Applied Chemistry*. 2005. № 8(77). С. 1445–1495.
79. Kubíček V. et al. Gallium(III) complexes of DOTA and DOTA-Monoamide: Kinetic and thermodynamic studies // *Inorganic Chemistry*. 2010. № 23(49). С. 10960–10969.
80. Larsson K. et al. Complications in complexation kinetics for lanthanides with DTPA using

- dye probe molecules in aqueous solution // RSC Advances. 2017. № 42(27). C. 26507–26512.
81. Blahut J. et al. A combined NMR and DFT study of conformational dynamics in lanthanide complexes of macrocyclic DOTA-like ligands // Physical Chemistry Chemical Physics. 2017. № 39(19). C. 26662–26671.
 82. Procházková S. et al. Lanthanide(III) complexes of monophosphinate/monophosphonate DOTA-analogues: effects of the substituents on the formation rate and radiolabelling yield // Dalton Transactions. 2018. № 37(47). C. 13006–13015.
 83. Severin A. V. et al. Sorption and diffusion behavior of actinium(III) ions in contact with hydroxyapatite as a transporter of medical radionuclides // Russian Chemical Bulletin. 2020. № 12(69). C. 2286–2293
 84. Aliev R.A. et al. Isolation of Medicine-Applicable Actinium-225 from Thorium Targets Irradiated by Medium-Energy Protons // Solvent Extraction and Ion Exchange. 2014. № 5(32). C. 468–477.
 85. Gans P., Sabatini A., Vacca A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs // Talanta. 1996. № 10(43). C. 1739–1753.
 86. Alderighi L. et al. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species // Coordination Chemistry Reviews. 1999. № 1(184). C. 311–318.
 87. Ernzerhof M., Scuseria G.E. Assessment of the Perdew-Burke-Ernzerhof exchange-correlation functional // Journal of Chemical Physics. 1999. № 11(110). C. 5029–5036.
 88. Caldeweyher E., Bannwarth C., Grimme S. Extension of the D3 dispersion coefficient model // Journal of Chemical Physics. 2017. № 3(147).
 89. Zheng J., Xu X., Truhlar D.G. Minimally augmented Karlsruhe basis sets // Theoretical Chemistry Accounts. 2011. № 3(128). C. 295–305.
 90. 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 // Physical Chemistry Chemical Physics. 2005. № 18(7). C. 3297–3305.
 91. Weigend F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn // Physical Chemistry

- Chemical Physics. 2006. № 9(8). C. 1057–1065.
92. Mitrofanov A. et al. A search for a DFT functional for actinide compounds // The Journal of Chemical Physics. 2021. № 16(155). C. 161103.
 93. Douglas M., Kroll N.M. Quantum electrodynamical corrections to the fine structure of helium // Annals of Physics. 1974. № 1(82). C. 89–155.
 94. Hess B.A. Relativistic electronic-structure calculations employing a two-component no-pair formalism with external-field projection operators // Physical Review A. 1986. № 6(33). C. 3742–3748.
 95. 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. // Physical Chemistry Chemical Physics. 2005. № 18(7). C. 3297–305.
 96. Pantazis D.A., Neese F. All-electron scalar relativistic basis sets for the 6p elements // Theoretical Chemistry Accounts. 2012. № 11(131). C. 1–7.
 97. Stoychev G.L., Auer A.A., Neese F. Automatic Generation of Auxiliary Basis Sets // Journal of Chemical Theory and Computation. 2017. № 2(13). C. 554–562.
 98. Chernyshov A.A., Veligzhanin A.A., Zubavichus Y. V. Structural Materials Science end-station at the Kurchatov Synchrotron Radiation Source: Recent instrumentation upgrades and experimental results // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. 2009. № 1–2(603). C. 95–98.
 99. Newville M. EXAFS analysis using FEFF and FEFFIT // Journal of Synchrotron Radiation. 2001. № 2(8). C. 96–100.
 100. McQuade P. et al. Investigation into ⁶⁴Cu-labeled Bis(selenosemicarbazone) and Bis(thiosemicarbazone) complexes as hypoxia imaging agents // Nuclear Medicine and Biology. 2005. № 2(32). C. 147–156.
 101. Joseph A.R. et al. Chemical Thermodynamics of Technetium. Volume 3. Amsterdam: Elsevier Science. 1999. 539 p.
 102. Desreux J., Merciny E., Loncin M.F. Nuclear magnetic resonance and potentiometric studies of the protonation scheme of two tetraaza tetraacetic macrocycles // Inorganic Chemistry. 1981. № 4(20). C. 987–991.

103. Letkeman P., Martell A.E. Nuclear Magnetic Resonance and Potentiometric Protonation Study of Polyaminopolyacetic Acids Containing from Two to Six Nitrogen Atoms // *Inorganic Chemistry*. 1979. № 5(18). C. 1284–1289.
104. Kodama M., Koike T., Anung Budhi Mahatma E.K. Thermodynamic and kinetic studies of lanthanide complexes of 1,4,7,10,13-pentaaazacyclopentadecane-N,N',N'',N''',N''''-pentaacetic acid and 1,4,7,10,13,16-hexaaazacyclooctadecane-N,N',N'',N''',N''''',N''''''-hexaacetic acid // *Inorganic Chemistry*. 1991. № 6(30). C. 1270–1273.
105. Thiele N.A., Wilson J.J. Actinium-225 for targeted α therapy: Coordination chemistry and current chelation approaches // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2018. № 8(33). C. 336–348.
106. Kerdjoudj R. et al. Scandium(III) complexes of monophosphorus acid DOTA analogues: A thermodynamic and radiolabelling study with ^{44}Sc from cyclotron and from a $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generator // *Dalton Transactions*. 2016. № 4(45). C. 1398–1409.
107. Morss L.R., Edelstein N.M., Fuger J. The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements. 2007. 699–812 p.
108. Thiele N.A. et al. An Eighteen-Membered Macrocyclic Ligand for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy // *Angewandte Chemie*. 2017. № 46(56). C. 14712–14717.
109. Kadassery K.J. et al. $\text{H}_2\text{BZmacropa-NCS}$: A Bifunctional Chelator for Actinium-225 Targeted Alpha Therapy // *Bioconjugate Chemistry*. 2022. № 6(33). C. 1222–1231.
110. Cacheris W.P., Nickle S.K., Sherry A.D. Thermodynamic Study of Lanthanide Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane-N,N',N'',N'''-tetraacetic Acid // *Inorganic Chemistry*. 1987. (26). C. 958–960.
111. Zielińska B., Bilewicz A. The hydrolysis of actinium // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2004. № 1(261). C. 195–198.
112. Haas J.R., Shock E.L., Sassani D.C. Rare earth elements in hydrothermal systems: Estimates of standard partial molal thermodynamic properties of aqueous complexes of the rare earth elements at high pressures and temperatures // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1995. № 21(59). C. 4329–4350.
113. Zapolotsky E.N., Qu Y., Babailov S.P. Lanthanide complexes with polyaminopolycarboxylates as prospective NMR/MRI diagnostic probes: peculiarities of molecular structure, dynamics and paramagnetic properties // *Journal of Inclusion*

- Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 2021. (102). C. 1–33.
114. Merzlyakova E. et al. 18-Crown-6 Coordinated Metal Halides with Bright Luminescence and Nonlinear Optical Effects // *Journal of the American Chemical Society*. 2021. № 2(143). C. 798–804.
 115. Roca-Sabio A. et al. Macrocyclic receptor exhibiting unprecedented selectivity for light lanthanides // *Journal of the American Chemical Society*. 2009. № 9(131). C. 3331–3341.
 116. Montavon G. et al. DTPA complexation of bismuth in human blood serum // *Dalton Transactions*. 2012. № 28(41). C. 8615–8623.
 117. Lima L.M.P. et al. H₂Me-do2pa: an attractive chelator with fast, stable and inert natBi³⁺ and ²¹³Bi³⁺ complexation for potential α -radioimmunotherapy applications // *Chemical Communications*. 2014. № 82(50). C. 12371–12374.
 118. Bader R.F.W. *Atoms in molecules: a quantum theory* // *International Series of Monographs on Chemistry*, 22. Oxford: Clarendon press, 1990.
 119. Lu T., Chen F. Multiwfn: A Multifunctional Wavefunction Analyzer // *Journal of Computational Chemistry*. 2011. № 5(33). C. 580–592.
 120. Shannon R.D. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides // *Acta Crystallographica Section A*. 1976. (A32). C. 751–767.
 121. Aime S., et al. A Novel Compound in the Lanthanide(III) DOTA Series. X-Ray Crystal and Molecular Structure of the Complex Na[La(DOTA)La(HDOTA)]·10H₂O // *Inorganic Chemistry*. 1997. № 19(36). C. 4287–4289.
 122. Delgado R. et al. Metal complexes of cyclen and cyclam derivatives useful for medical applications: A discussion based on thermodynamic stability constants and structural data // *Dalton Transactions*. 2007. № 26. C. 2734–2745.
 123. Viola-Villegas N., Doyle R.P. The coordination chemistry of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetra acetic acid (H₄DOTA): Structural overview and analyses on structure-stability relationships // *Coordination Chemistry Reviews*. 2009. № 13–14(253). C. 1906–1925.
 124. Etschmann B.E. et al. The role of Te(IV) and Bi(III) chloride complexes in hydrothermal mass transfer: An X-ray absorption spectroscopic study // *Chemical Geology*. 2016. (425).

- C. 37–51.
125. Moreau J. et al. Complexing Mechanism of the Lanthanide Cations Eu^{3+} , Gd^{3+} , and Tb^{3+} with 1,4,7,10-Tetrakis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (dota)— Characterization of Three Successive Complexing Phases: Study of the Thermodynamic and Structural Properties of // *Chemistry - A European Journal*. 2004. № 20(10). C. 5218–5232.
 126. Jang Y.H. et al. Mechanism and Energetics for Complexation of ^{90}Y with Model for Cancer Radioimmunotherapy // *Journal of American Chemical Society*. 1999. № 26(121). C. 6142–6151.
 127. Kneifel S. et al. Local Targeting of Malignant Gliomas by the Diffusible Targeting of Malignant Gliomas by the Diffusible Peptidic // *Clinical Cancer Research*. 2006. № 12(12). C. 3843–3850.
 128. Norenberg J.P. et al. Radionuclide Therapy of Pancreatic Tumors in a Preclinical Animal Model Therapy of Pancreatic Tumors in a Preclinical Animal Model // *Clinical Cancer Research*. 2006. № 12(3 Pt 1)(1). C. 897–903.
 129. Olin Å. et al. Studies on the Hydrolysis of Metal Ions. 19. The Hydrolysis of Bismuth(III) in Perchlorate Medium. // *Acta Chemica Scandinavica*. 1957. № 9(11). C. 1445–1456.
 130. Chong H.S. et al. In vitro and in vivo evaluation of novel ligands for radioimmunotherapy // *Nuclear Medicine and Biology*. 2006. № 4(33). C. 459–467.
 131. Hu A. et al. Chelating the Alpha Therapy Radionuclides $^{225}\text{Ac}^{3+}$ and $^{213}\text{Bi}^{3+}$ with 18-Membered Macrocyclic Ligands Macrodipa and Py-Macrodipa // *Inorganic Chemistry*. 2022. № 2(61). C. 801–806.
 132. Stein B.W. et al. Advancing Chelation Chemistry for Actinium and Other +3 f-Elements, Am, Cm, and La // *Journal of the American Chemical Society*. 2019. № 49(141). C. 19404–19414.
 133. Friend M.T. et al. Extraction chromatography of ^{225}Ac and lanthanides on N,N-dioctyldiglycolamic acid/1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide solvent impregnated resin // *Journal of Chromatography A*. 2020. (1624). C. 461219.
 134. Ramogida C.F. et al. Evaluation of polydentate picolinic acid chelating ligands and an α -melanocyte-stimulating hormone derivative for targeted alpha therapy using ISOL-produced ^{225}Ac // *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. 2019. № 1(4). C. 21.

135. Brechbiel M.W. et al. Preparation of the Novel Chelating Agent N-(2-Aminoethyl)-trans-1,2-diaminocyclohexane- N,N',N''-pentaacetic Acid (H₅CyDTPA), a Preorganized Analogue of Diethylenetriaminepentaacetic Acid (H₅DTPA), and the Structures of Bi^{III}(CyDTPA)²⁻ and Bi^{III}(H₂DTPA) Complexes // *Inorganic Chemistry*. 1996. № 21(35). C. 6343–6348.
136. Kubíček V. et al. Gallium (III) Complexes of DOTA and DOTA - Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies // *Inorganic Chemistry*. 2010. № 23(49). C. 10960–10969.
137. Tircsó G. et al. Comparison of the equilibrium , kinetic and water exchange properties of some metal ion-DOTA and DOTA-bis (amide) complexes // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2020. (206). C. 111042.
138. Torres S. et al. Radiolabeled ¹⁵³Sm-chelates of glycoconjugates: Multivalence and topology effects on the targeting of the asialoglycoprotein receptor // *Radiochimica Acta*. 2007. № 6(95). C. 343–349.
139. Ruegg C.L. et al. Improved in Vivo Stability and Tumor Targeting of Bismuth-labeled Antibody // *Cancer Research*. 1990. № 14(50). C. 4221–4226.
140. Camera L. et al. Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies // *Journal of Nuclear Medicine*. 1994. № 5(35). C. 882–889.
141. Thakur P. et al. Complexation thermodynamics and structural studies of trivalent actinide and lanthanide complexes with DTPA, MS-325 and HMDTPA // *Radiochimica Acta*. 2013. № 4(101). C. 221–232.
142. Taylor D.M. The metabolism of actinium in the rat // *Health Physics*. 1970. № 3(19). C. 411–418.
143. Atsuchi Ando, Itsuko Ando T.H., Hisada K. Relation between the location of elements in the periodic table and tumor-uptake rate // *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*. 1985. № 1(16). C. 57–80.

Приложение

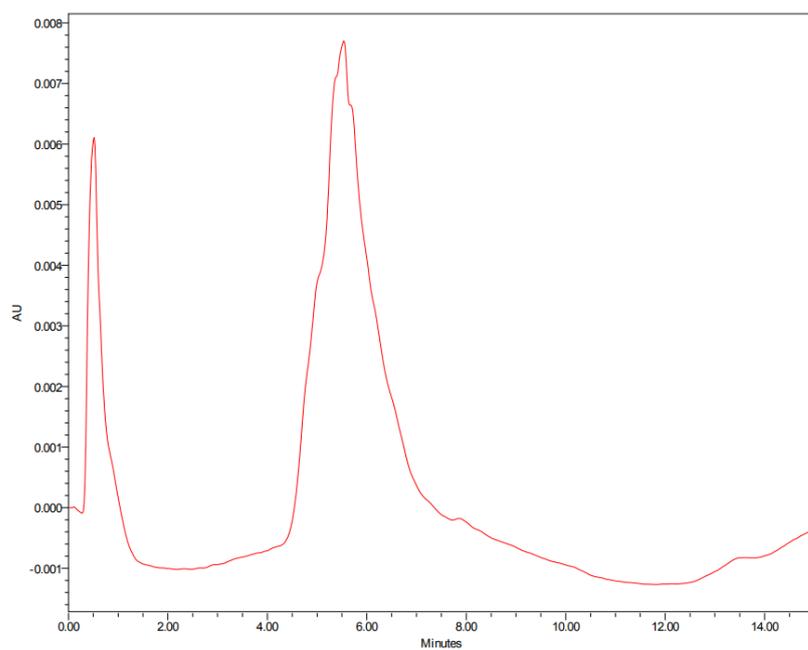


Рисунок П1. УФ-хроматограмма ВЭЖХ комплекса [LaBATA]⁻ (0,5 мкМ), λ = 272 нм.

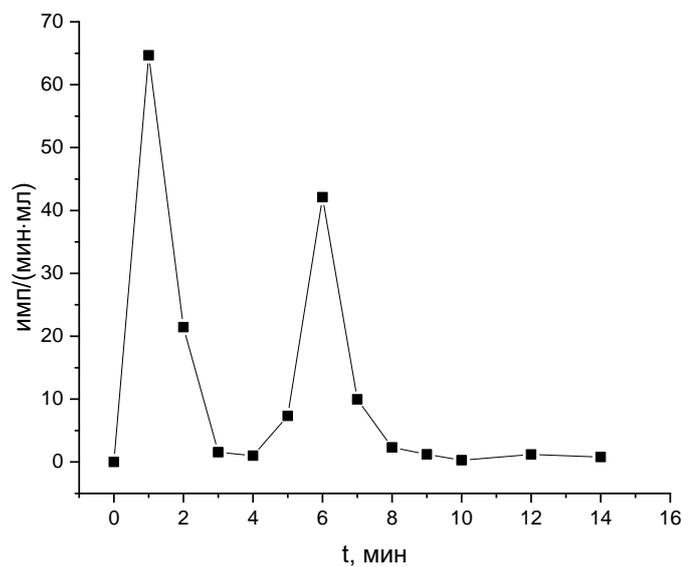


Рисунок П2. ВЭЖХ-хроматограмма комплекса [²²⁸Ac]AcBATA⁻ (0,2 мкМ).

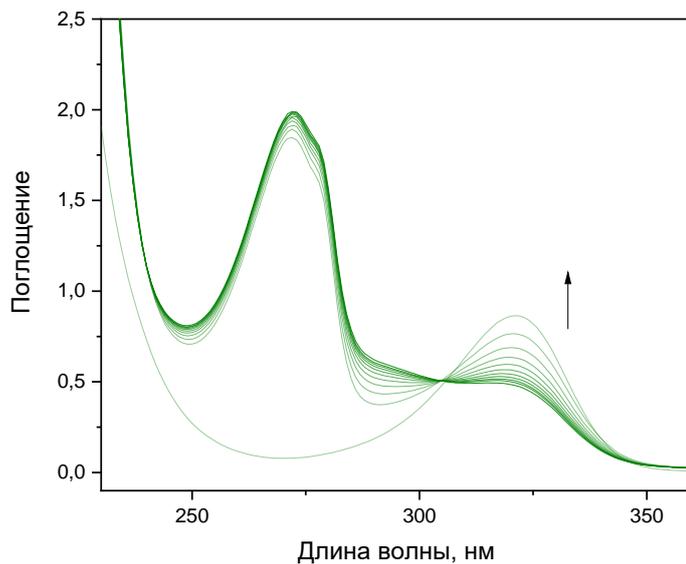


Рисунок П3. Изменение УФ-спектров с течением времени растворов Vi^{3+} в присутствии 10-кратного избытка H_4BATA при $25\text{ }^\circ\text{C}$ и $0,15\text{ M H}^+$: спектры получены с интервалом 22 с в течение 5 мин.

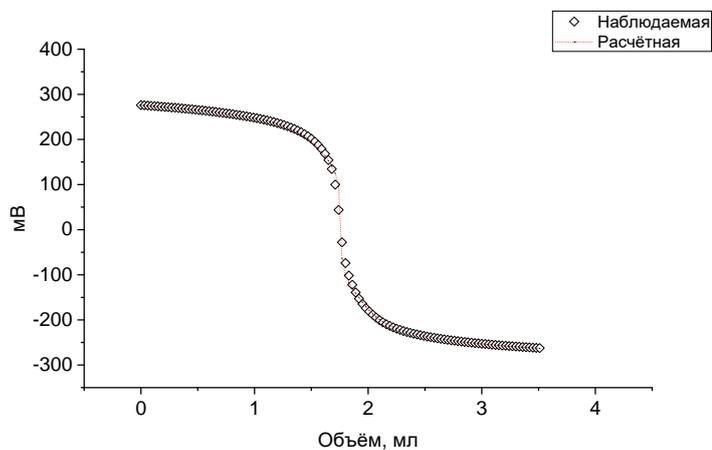


Рисунок П4. Расчётная и наблюдаемая кривые титрования лиганда H_4BATA .

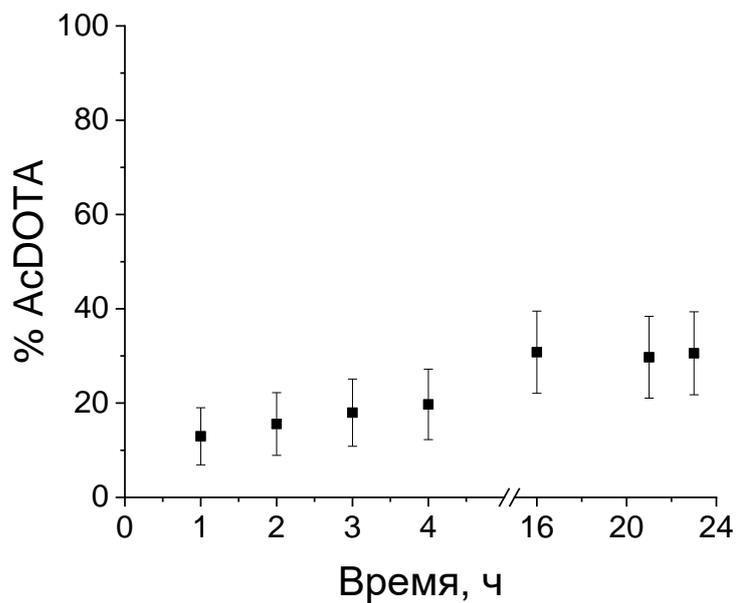


Рисунок П5. Зависимость содержания AcDOTA в растворе от времени выдержки при 90 °С, полученная методом сорбции на целлюлозе, рН 6,5.

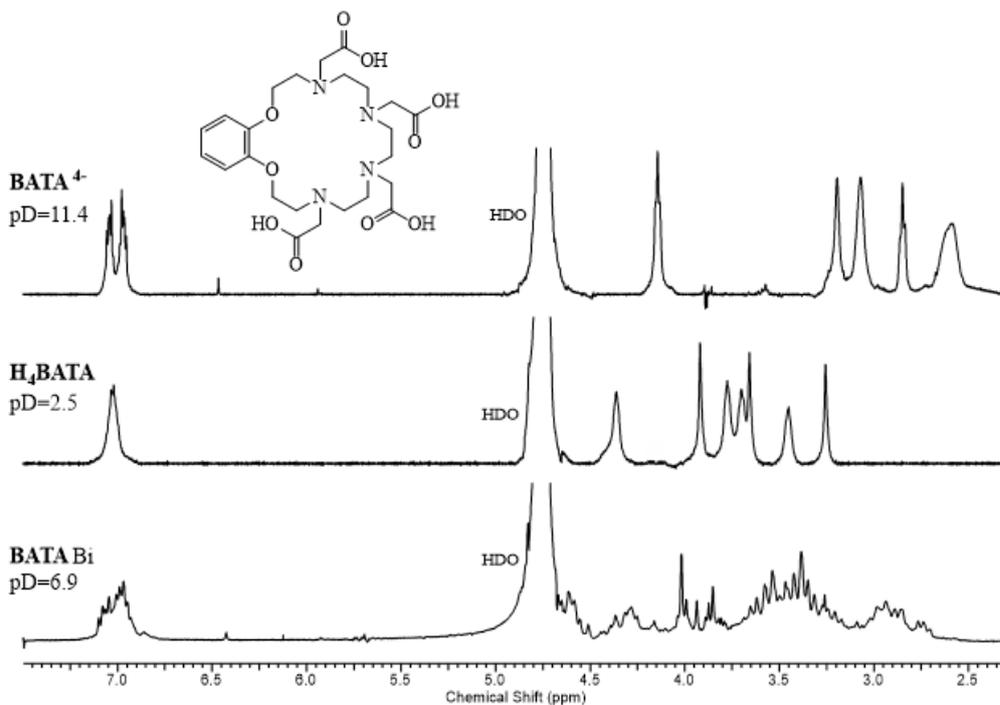


Рисунок П6. ¹H ЯМР спектр H₄BATA и его комплекса с Bi³⁺ при различных pD в D₂O.

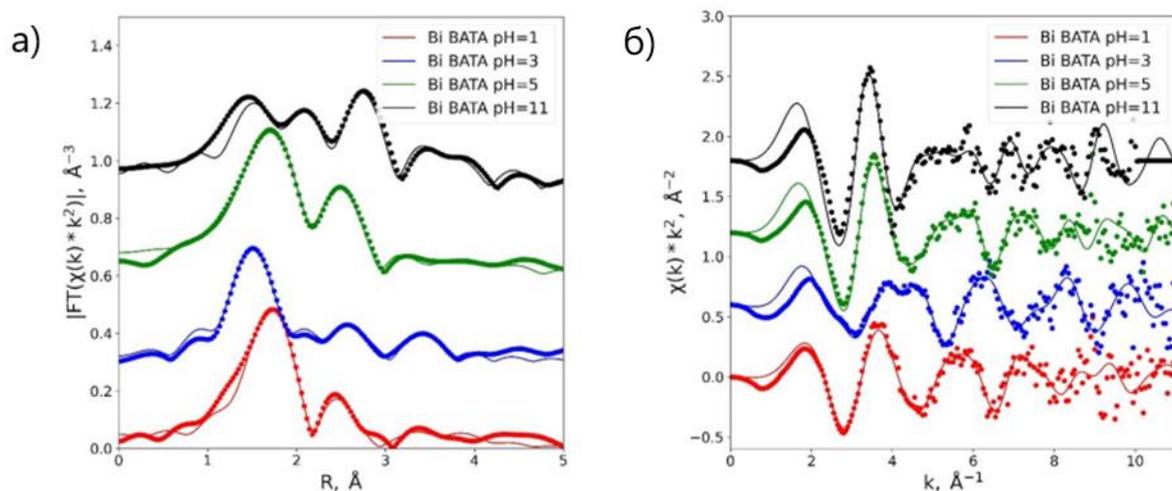


Рисунок П7. Обработка спектров рентгеновского поглощения для комплекса Bi^{3+} с H_4BATA при разных значениях pH а) в R -пространстве б) в k -пространстве.

Диаграммы распределения форм Bi^{3+} в системах Bi -BATA, Bi -DOTA и Bi -DTPA в условиях проведения спектрофотометрии:

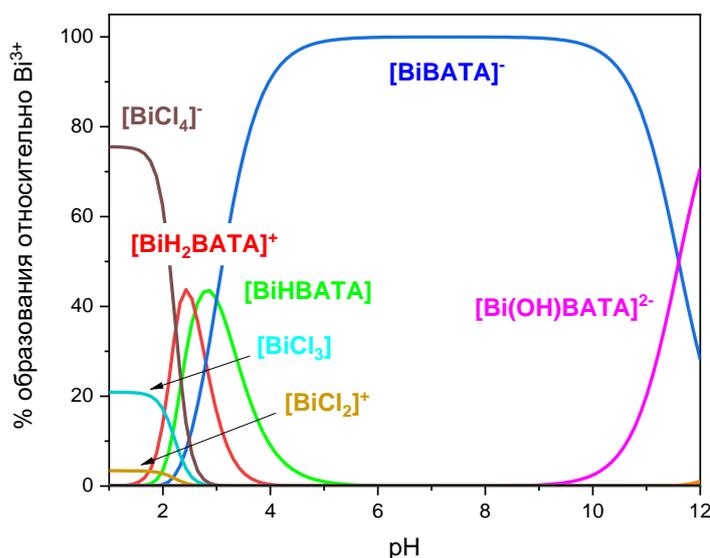


Рисунок П8. Диаграмма распределения форм Bi^{3+} для системы Bi -BATA в условиях исследования кинетики комплексообразования: $c_L = 800 \mu\text{M}$; $c_{\text{Bi}} = 80 \mu\text{M}$; $I = 0,6 \text{ M (K,H)Cl}$.

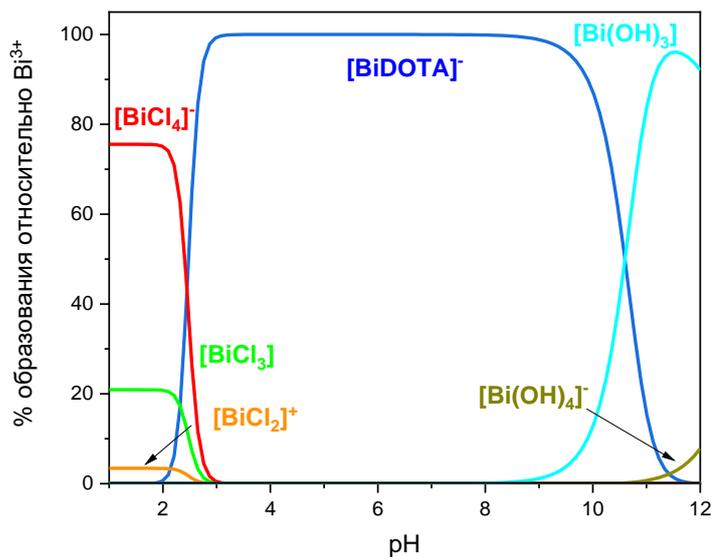


Рисунок П9. Диаграмма распределения форм Bi^{3+} в системе Bi-DOTA в условиях: $c_L = 800 \mu M$; $c_{Bi} = 80 \mu M$ (исследование кинетики комплексообразования).

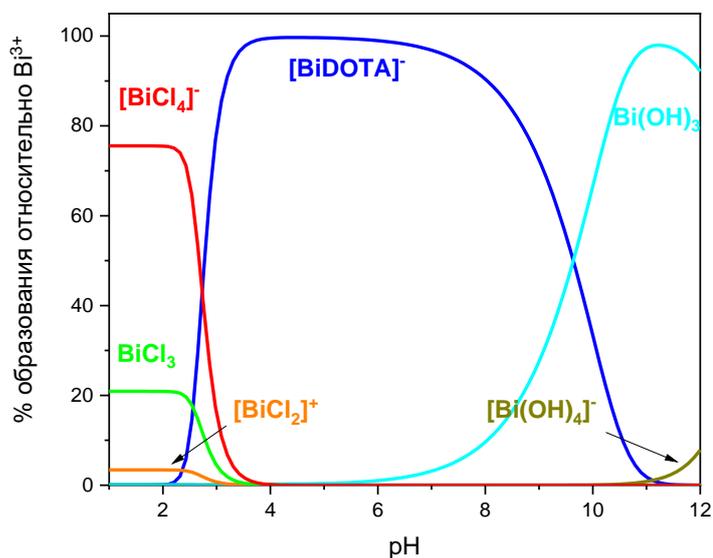


Рисунок П10. Диаграмма распределения форм Bi^{3+} в системе Bi-DOTA в условиях: $c_L = 80 \mu M$; $c_{Bi} = 80 \mu M$; $I = 0,6 M (K,H)Cl$ (исследование кинетики диссоциации).

Диаграммы распределения форм Bi^{3+} в системе Bi-DTPA в условиях исследования кинетики комплексообразования и диссоциации практически не отличались:

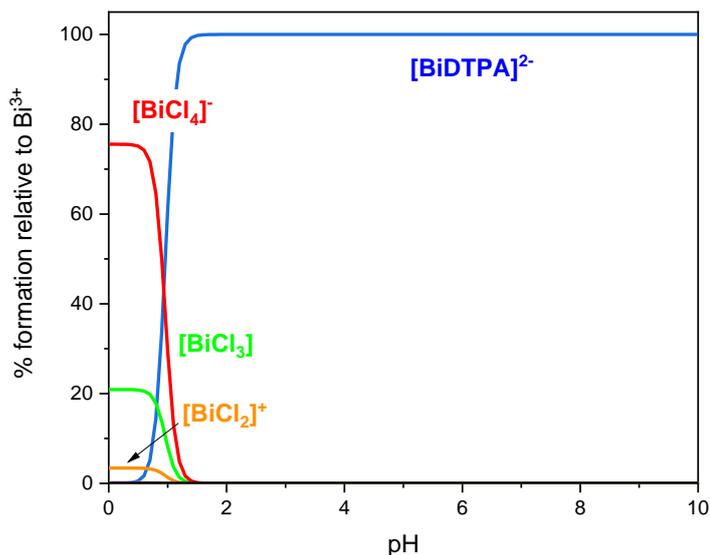


Рисунок П11. Диаграмма распределения форм Bi^{3+} в системе Bi -ДТРА в условиях: $c_L = 800 \mu\text{M}$; $c_{\text{Bi}} = 80 \mu\text{M}$ (исследование кинетики комплексообразования) и $c_L = 80 \mu\text{M}$; $c_{\text{Bi}} = 80 \mu\text{M}$; $I = 0,6 \text{ M}$ $(\text{K},\text{H})\text{Cl}$ (исследование кинетики диссоциации).

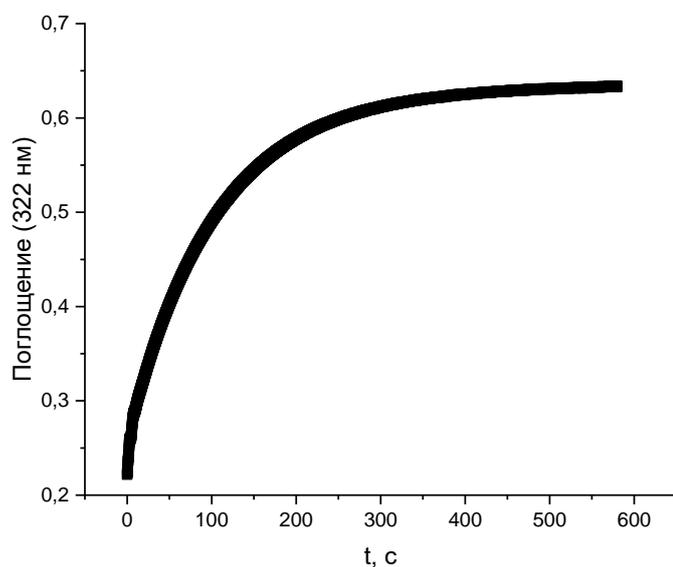


Рисунок П12. Изменение поглощения пика BiCl_4^- (322 нм) в УФ-спектре в процессе диссоциации комплекса Bi^{3+} с $\text{H}_4\text{ВТА}$ в $0,21 \text{ M}$ HCl ($I = 0,6$ $(\text{H},\text{K})\text{Cl}$) при $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ с течением времени.

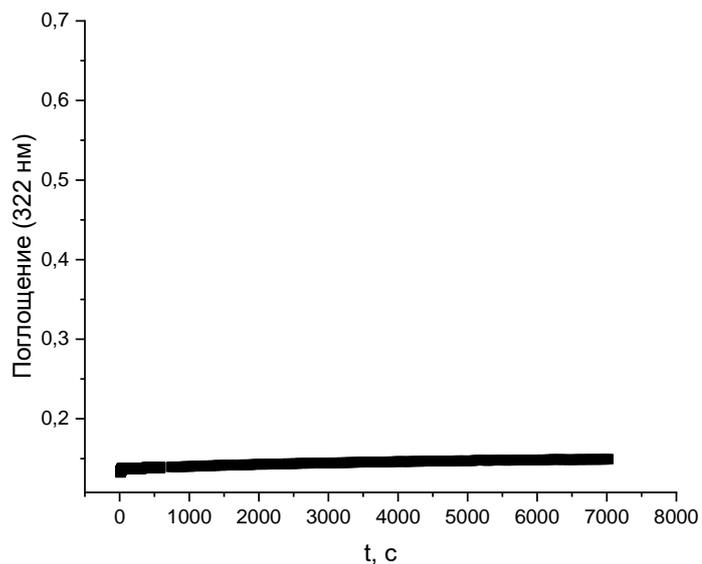


Рисунок П13. Изменение поглощения пика ViCl_4^- (322 нм) в УФ-спектре в процессе диссоциации комплекса Vi^{3+} с H_4BATA в 0,14 М HCl ($I = 0,6$ (Н,К)Cl) при 25,0 °С с течением времени.

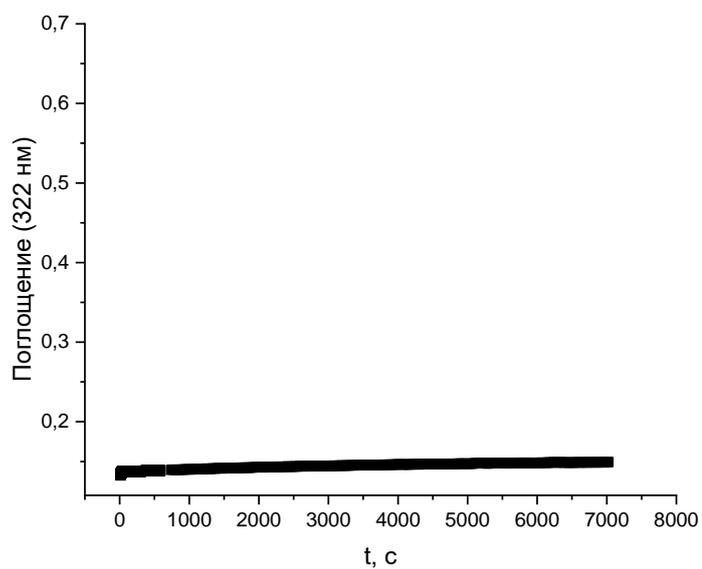


Рисунок П14. Изменение поглощения пика ViCl_4^- (322 нм) в УФ-спектре в процессе диссоциации комплекса Vi^{3+} с H_4BATA в 0,01 М HCl ($I = 0,6$ (Н,К)Cl) при 25,0 °С с течением времени.

Благодарности

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю Егоровой Байирте Владимировне за заразительную увлечённость наукой, за способность браться за любую задачу и веру в автора, а также благодарит:

ИНЭОС РАН лабораторию фотоактивных супрамолекулярных систем под рук. д.х.н., проф. Фёдоровой Ольги Анатольевны, Пашанову Анну Вячеславовну и Зубенко Анастасию Дмитриевну за синтез H_4VATA и продуктивную совместную работу; Ермолаева Станислава Викторовича и Васильева Александра Николаевича за предоставление ^{225}Ac для проведения эксперимента *in vivo*; Тригуба Александра Леонидовича за проведение анализа методом EXAFS и помощи в интерпретации данных, а также Конопкину Екатерину Александровну; Митрофанова Артёма Александровича за помощь в расчётах структуры комплексов методом DFT; Алёшина Глеба Юрьевича и Замуруеву Любовь Сергеевну за проведение *in vivo* экспериментов; Евсюнину Марию Валерьевну и Герасимова Михаила Алексеевича за помощь в измерениях методом ИСП-МС.

Преснякова Игоря Александровича, Максимова Георгия Владимировича и, в особенности, Афанасова Михаила Ивановича за внимательное рецензирование работы, ценные правки и наставления, а также Кожину Галину Евгеньевну за ценные замечания;

Коллег лаборатории радиофармацевтической химии за лёгкость в совместной работе, поддержку, трудолюбие и за возможность работать в удовольствие с прекрасными людьми;

Коллег кафедры радиохимии за тёплую и энергичную атмосферу, а также, в частности, Петрова Владимира Геннадиевича за замечания по работе и Матвеева Петра Игоревича за интерес к работе, Калмыкова Степана Николаевича за лекцию, из-за которой автор выбрал кафедру радиохимии;

Пазюк Елену Александровну, а также школьных учителей по физике за знания и веру в автора;

Семью, дядю за всестороннюю поддержку и опору; а также близких людей, в особенности Федотову Анжелику Олеговну, Бахия Тамуну Романовну, Замуруеву Любовь Сергеевну и Евсюнину Марию Валерьевну за то, что появились в жизни автора, за свет, шутки и единство ценностей, а также за помощь на всех этапах работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФ №18-73-10035, РФФИ №20-33-90156. Работа выполнена в рамках проекта № 075-15-2020-782 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.