

**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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

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

**Научный руководитель**

**Егорова Байирта Владимировна** – кандидат химических наук

**Официальные оппоненты**

**Деев Сергей Михайлович** – доктор биологических наук, академик РАН, институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, зав. лабораторией молекулярной иммунологии

**Успенская Ирина Александровна** – доктор химических наук, ФГБОУ Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, профессор кафедры физической химии

**Лапшина Елена Владимировна** – кандидат химических наук, ФГБУН Институт ядерных исследований Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории радиоизотопного комплекса

Защита диссертации состоится «15» ноября 2023 г. в 16 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 10, ауд. 308.

E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (А.В. Северин, ученый секретарь диссертационного совета МГУ.014.6); ek.matazova@yandex.ru (Е.В. Матазова, соискатель)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.6/2679>

Автореферат разослан «\_\_\_» октября 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Северин Александр Валерьевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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  $^{131}\text{I}$  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  $\beta^-$ -излучателя [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOТА-TATE для лечения нейроэндокринных опухолей и [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617 для лечения метастазирующего рака простаты недавно были одобрены и уже успешно применяются в медицинской практике [1]. Однако  $\alpha$ -излучающие радионуклиды все чаще рассматриваются в качестве новых и более эффективных радиофармпрепаратов для терапии метастаз и небольших опухолей, по сравнению с  $\beta^-$ -излучателями. Это обусловлено более высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ)  $\alpha$ -частиц, в результате чего они более цитотоксичны, чем  $\beta^-$ -излучатели. Кроме того, радиофармпрепараты (РФП) на основе  $\alpha$ -частиц позволяют использовать более низкие уровни радиоактивности, на уровне десятков МБк. Пептид-рецепторную терапию с использованием  $\alpha$ -излучателей обычно называют таргетной альфа-терапией (ТАТ). Одними из наиболее подходящих для ТАТ радионуклидов являются  $^{212,213}\text{Bi}$  и  $^{225}\text{Ac}$ . Наибольшее внимание уделяется  $^{225}\text{Ac}$ , 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 изо-

топов висмута предпочтение отдается  $^{213}\text{Bi}$  с периодом полураспада 46 мин в силу отсутствия в силу отсутствия среди дочерних продуктов его распада высокоэнергетического гамма-излучения. Ввиду относительно короткого периода полураспада применение  $^{213}\text{Bi}$  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  $^{213}\text{Bi}$  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  $\text{H}_4\text{DOTA}$  и  $\text{H}_5\text{DTPA}$  (структурные формулы и номенклатурные названия представлены на стр. 8). Макроциклический лиганд 12-азакраун-4  $\text{H}_4\text{DOTA}$  часто используется в РФП на основе коротких пептидов, поскольку комплексообразование с  $\text{H}_4\text{DOTA}$  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  $\text{H}_4\text{DOTA}$  ациклический лиганд  $\text{H}_5\text{DTPA}$  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  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Ac}^{3+}$  остается актуальной проблемой современной ядерной медицины.

Новый бензоазакраун-лиганд  $\text{H}_4\text{BATA}$  обладает большим размером макроцикла по сравнению с 12-краун-4 макроциклом  $\text{H}_4\text{DOTA}$ , 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  $\text{H}_4\text{BATA}$  по отношению к катионам  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Ac}^{3+}$  и  $\text{La}^{3+}$ , определению эффективности радиоактивного мечения лиганда  $\text{H}_4\text{BATA}$ , 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 потенциометрического 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 меченя  $H_4BATA$  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  $\text{H}_4\text{BATA}$  с  $\text{Bi}^{3+}$  не уступают, а с  $\text{Ac}^{3+}$  превосходят соответствующие константы устойчивости комплексов этих катионов с  $\text{H}_4\text{DOTA}$ , в результате чего радиоактивное мечение происходит при меньшей концентрации лиганда.
3. Высокая кинетическая стабильность комплекса  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  *in vitro* и низкое накопление *in vivo* обусловлены высокой инертностью форм  $[\text{BiBATA}]^-$  и  $[\text{BiHBATA}]$ .

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Показано, что структура макроцикла 18-краун-6 с ацетатными координирующими группами эффективно координирует крупные катионы  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Ac}^{3+}$  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 бензоазотетраацетатом  $\text{H}_4\text{BATA}$  с катионами  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Ac}^{3+}$ . Лиганд  $\text{H}_4\text{BATA}$  может быть использован для создания РФП 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.

#### **Структура и объём работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения в семи главах, выводов, списка литературы и приложений. Список литературы включает 147 наименований. Диссертация изложена на 110 страницах, содержит 30 рисунков и 10 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

**В обзоре литературы** три части. В первой рассмотрены современные радиофармпрепараты терапевтического назначения и, в частности, используемые радиофармпрепараты для таргетной альфа-терапии. Во второй части рассмотрены основные макроциклические лиганды, которые используются для связывания катиона с биомолекулой и получения радиофармпрепаратов, рассматривается их скорость комплексообразования и кинетическая стабильность комплексов в сыворотке крови и в организме. Третья часть посвящена вопросам детального физико-химического исследования процесса комплексообразования, в том числе методам, которые используются для определения констант устойчивости, описаны их ограничения, влияние фонового электролита, гидролиза катиона и наличие высокоустойчивых протонированных форм комплекса.

**Экспериментальная часть** содержит подробное описание методик определения констант устойчивости комплексных соединений висмута, актиния и лантана с исследуемым лигандом. Также представлены используемые базисные наборы для определения структуры комплексов в водном растворе методом теории функционала плотности. Описана методика исследования кинетики диссоциации комплексного соединения висмута с бензоазакраунлигандом. Приведена методика определения кинетической стабильности исследуемых комплексных соединений *in vitro* и условия исследования распределения в организме мышей.

Ниже приведены структурные формулы исследуемых лигандов  $H_4BATA$  (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),  $H_4DOTA$  (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота),  $H_5DTPA$  (2,2',2'',2'''-[[[(карбоксиметил)азандиил]бис(этан-2,1-диилнитрило)]]тетрауксусная кислота):

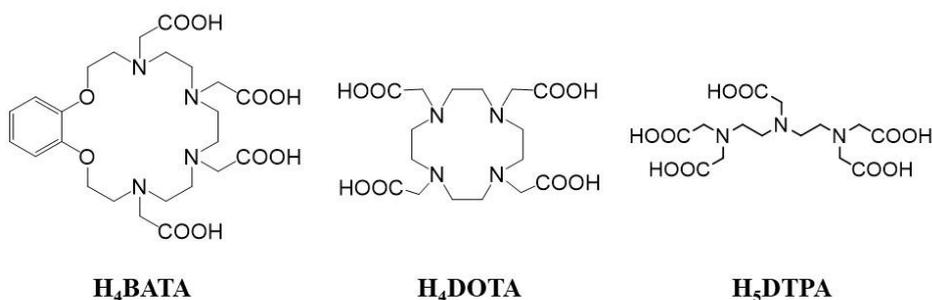


Рисунок 1. Структурные формулы лигандов  $H_4BATA$ ,  $H_4DOTA$  и  $H_5DTPA$ .

**Обсуждение результатов** разделено на 7 глав, посвящённых определению констант протонирования лиганда и устойчивости комплексов (главы 1 и 2), исследованию структуры комплексов с исследуемыми металлами (глава 3), подбору условий синтеза и определения радиохимической чистоты комплексов (глава 4), сравнение скорости образования и диссоциации комплексов висмута с исследуемым лигандом и типовыми лигандами, а также определение протон-ассоциированного механизма диссоциации комплекса с висмутом (глава 5), определение кинетической стабильности комплексов висмута и актиния *in vitro* и биораспределения *in vivo* (глава 6 и 7).

### Определение констант протонирования лиганда H<sub>4</sub>BATA

Для определения констант устойчивости комплексов лиганда H<sub>4</sub>BATA с исследуемыми катионами в первую очередь были определены константы протонирования H<sub>4</sub>BATA методом потенциометрического титрования при 25°C в 0,1 М водном растворе KNO<sub>3</sub> с обработкой полученных данных с помощью программы HyperQuad. Рассчитанные константы протонирования лиганда H<sub>4</sub>BATA, а также известные из литературы [2] константы протонирования лиганда H<sub>4</sub>DOTA, который на практике чаще всего используется в качестве хелатирующего агента, представлены в

Таблица 1.

Таблица 1. Значения ступенчатых констант протонирования лигандов H<sub>4</sub>BATA и H<sub>4</sub>DOTA.

	H <sub>4</sub> BATA	H <sub>4</sub> DOTA
	$lgK_{HhL}$	$lgK_{Hh}$ [2]
H <sub>1</sub> L	11,9 ± 0,2	11,08 ± 0,07
H <sub>2</sub> L	10,0 ± 0,1	9,23 ± 0,02
H <sub>3</sub> L	8,4 ± 0,2	4,24 ± 0,02
H <sub>4</sub> L	5,2 ± 0,3	4,18 ± 0,03
H <sub>5</sub> L	2,6 ± 0,4	1,88 ± 0,06
H <sub>6</sub> L	–	1,71 ± 0,07

Первые четыре ступенчатые константы протонирования H<sub>4</sub>BATA соответствуют протонированию аминогрупп макроцикла, а значение  $lgK_{H5L} = 2,6$  соответствует протонированию одной из четырех карбоксильных групп подобно протонированию -COOH группы молекул H<sub>4</sub>EDTA, H<sub>5</sub>DTPA и других аминов. Сравнение констант протонирования H<sub>4</sub>BATA и H<sub>4</sub>DOTA показывает, что все четыре аминогруппы H<sub>4</sub>BATA обладают более основными свойствами, чем аминогруппы H<sub>4</sub>DOTA. Последовательное протонирование H<sub>4</sub>BATA

ближе к схеме протонирования ациклических лигандов, чем к  $H_4DOTA$ . Можно предположить, что это 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.

### **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 $H_4BATA$*

Стандартный метод потенциометрического титрования для определения константы устойчивости комплекса требует, как минимум, миллимолярных концентраций и неприменим для комплексов с  $Ac^{3+}$ . В этом случае для оценки константы устойчивости обычно вместо  $Ac^{3+}$  проводят титрование  $La^{3+}$  из-за химического сходства этих катионов. Полученные значения констант устойчивости комплексов форм  $[LaBATA]^-$  и  $[LaHBATA]^-$  представлены в Таблица 2. Сравнение с известными из литературы значениями константы  $[LaDOTA]^-$  говорят о более высокой термодинамической устойчивости  $[LaBATA]^-$ . Однако, несмотря на сходство  $La^{3+}$  и  $Ac^{3+}$ , параметры комплексообразования этих катионов могут отличаться. Поэтому определение константы устойчивости комплексов именно с  $Ac^{3+}$  представляет особый интерес. Для определения констант устойчивости комплексов  $[AcBATA]^-$  и  $[AcDOTA]^-$  в следовых количествах с меткой  $^{228}Ac$  был использован метод жидкостной экстракции ДЭГФК, используемый и в случае  $Bi^{3+}$ . Для проведения эксперимента был подобран подходящий диапазон значений pH, при которых в измеримых количествах представлены как свободные формы катиона, так и различные формы комплекса. Экстракционную методику апробировали с  $[LaBATA]^-$ , используя лантан природного изотопного состава, и измеряли содержание  $^{139}La^{3+}$  методом ИСП-МС. Полученные методом потенциометрического титрования и экстракции константы устойчивости ( $27,5 \pm 0,3$  и  $27,0 \pm 0,3$  соответственно) сошлись в пределах погрешности. Поэтому данную методику использовали для определения констант устойчивости комплексов с  $Ac^{3+}$ . Константа устойчивости  $[AcDOTA]^-$ , полученная методом экстракции ( $lgK_{AcDOTA} = 20,4 \pm 0,3$ ), хорошо согласуется с константой, полученной авторами [3] методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) ( $lgK_{AcDOTA} = 19,7 \pm 0,4$ ). Значение константы устойчивости  $[AcBATA]^-$  оказывается выше значения для  $[AcDOTA]^-$ , что свидетельствует о высоком сродстве  $Ac^{3+}$  к  $H_4BATA$ . Кроме того, константа устойчивости  $[AcBATA]^-$ , полученная методом экстракции, коррелирует с константой устойчивости  $[LaBATA]^-$ . Значения  $pLa$  ( $pM = -lg[M^{m+}]_{своб}$ , рассчитывается с использованием констант протонирования лиганда, гидролиза металла, устойчивости комплекса) комплекса  $[LaBATA]^-$  оказываются выше, чем у большинства комплексов, изученных ранее, даже с

ациклическими лигандами, что указывает на высокую термодинамическую устойчивость комплексов [LaBATA]<sup>-</sup> и [AcBATA]<sup>-</sup>.

Таблица 2. Константы устойчивости (*lgK*) и *pAc* комплексов [AcDOTA]<sup>-</sup> и [AcBATA]<sup>-</sup>, полученных методом экстракции и константы устойчивости (*lgK*) и *pLa* комплексов La<sup>3+</sup> с H<sub>4</sub>DOTA и H<sub>4</sub>BATA, полученных методом потенциометрического титрования.

	<b>H<sub>4</sub>DOTA</b>	<b>H<sub>4</sub>BATA<sup>a</sup></b>
Ac <sup>3+</sup> + L <sup>4-</sup> = [AcL] <sup>-</sup>	20,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	26,0 ± 0,3
<i>pAc</i>	16,3	18,8
La <sup>3+</sup> + L <sup>4-</sup> = [LaL] <sup>-</sup>	22,9 <sup>c</sup>	27,0 ± 0,2
LaL <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> = [LaHL]	-	2,7 ± 0,2
[La(OH)L] <sup>2-</sup> + H <sup>+</sup> = [LaL] <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	-	10,5 ± 0,3
<i>pLa</i>	16,0	19,9

<sup>a</sup> 0,1 М KNO<sub>3</sub> при 25°C; <sup>b</sup> 0,1 М NaClO<sub>4</sub> при 90°C; <sup>c</sup> 0,1 М KCl при 25°C [4].

#### Константы устойчивости комплексов Bi<sup>3+</sup> с H<sub>4</sub>DOTA и H<sub>4</sub>BATA

Для определения констант устойчивости комплекса Bi<sup>3+</sup> с H<sub>4</sub>BATA, было проведено потенциометрическое титрование в присутствии избытка хлорид-иона, который связывал свободный катион металла в комплекс, предотвращая гидролиз при низких значениях pH. В исследуемом диапазоне pH были обнаружены протонированные формы комплекса [BiH<sub>2</sub>BATA]<sup>+</sup>, [BiHBATA], а также [BiBATA]<sup>-</sup> и [Bi(OH)BATA]<sup>2-</sup>. Полученные значения констант устойчивости комплексных форм Bi<sup>3+</sup> с H<sub>4</sub>BATA представлены в Таблица 3.

Таблица 3. Ступенчатые константы устойчивости и *pBi* комплексов Bi<sup>3+</sup> с H<sub>4</sub>BATA и H<sub>4</sub>DOTA.

	Ступенчатые константы устойчивости ( <i>lgK</i> )	
	Экстракция	Спектрофотометрическое титрование [5]
<b>H<sub>4</sub>DOTA</b> Bi <sup>3+</sup> + L = BiL <i>pBi</i>	28,5 ± 0,4 24,4 <sup>[a]</sup>	30,3 ± 0,02 28,0 <sup>[6]</sup>
<b>H<sub>4</sub>BATA</b> Bi <sup>3+</sup> + L = BiL BiL + H <sup>+</sup> = BiHL BiHL + H <sup>+</sup> = BiH <sub>2</sub> L BiLOH + H <sup>+</sup> = BiL + H <sub>2</sub> O <i>pBi</i>	34,4 ± 0,4 3,0 ± 0,4 2,6 ± 0,4 -	Потенциометрическое титрование 31,7 ± 0,2 4,2 ± 0,2 3,0 ± 0,2 9,4 ± 0,2 24,1

<sup>a</sup> Использованы константы протонирования H<sub>4</sub>DOTA, полученные при 90°C в 0,1 М электролите без Na<sup>+</sup> [3]. <sup>b</sup> Использованы константы протонирования H<sub>4</sub>DOTA, полученные при 25 °C в 1 М NaBr [5].

\* Заряды лиганда и комплексов опущены для упрощения.

При потенциометрическом титровании создавался на порядок больший избыток хлорид-ионов относительно лиганда и металла, из-за чего, как видно из Рисунок 2а, при низких значениях рН висмут присутствует в растворе в форме хлоридных комплексов. Однако при построении диаграммы распределения форм висмута от рН согласно определенным значениям  $lgK$  в отсутствие хлорид-ионов Рисунок 2б, в этой области преобладали формы комплекса с протонированным лигандом из-за высоких значений их констант устойчивости. Иными словами, в отсутствие хлорид-ионов висмут в растворе находился в форме комплекса с протонированным лигандом даже при значениях рН < 2. В этом случае потенциометрическое титрование хуже описывает константы устойчивости. Это связано с тем, что данный метод по изменению содержания протонов позволяет понять, влияют ли еще какие-то реакции помимо реакций гидролиза катиона и протонирования лиганда на равновесное значение рН. Поэтому при низких значениях рН, когда содержание протонов достаточно высокое, достоверно определить небольшие изменения в их содержании сложно, и, следовательно, содержание равновесных форм комплекса тоже. Значения констант устойчивости комплекса  $Bi^{3+}$  с  $H_4BATA$ , полученных методом потенциометрического титрования, уточняли методом жидкостной экстракции Д2ЭГФК. Сначала этим методом определяли константы устойчивости комплекса  $[BiDOTA]^-$ . Значение  $lgK = 28,5(4)$  при ионной силе  $I = 0,1$  М  $KNO_3$  и  $90^\circ C$  согласуется с данными потенциометрического титрования [5]:  $lgK = 30,3$  при  $I = 1$  М  $NaBr$  и  $25^\circ C$  (Таблица 3). Расхождение константы устойчивости  $[BiDOTA]^-$ , полученной методом экстракции, со значениями, известными из литературы, может быть связано с различной ионной силой, а также с недостаточно точными константами протонирования  $H_4DOTA$  при  $90^\circ C$ .

Константы устойчивости всех форм комплекса  $Bi^{3+}$  с  $H_4BATA$ , полученные методом экстракции (Таблица 3), оказываются несколько выше установленных в ходе потенциометрического титрования за счет проведения экстракции при более низких значениях рН, где метод потенциометрического титрования даёт менее надёжные результаты. Диаграмма распределения форм  $Bi^{3+}$  в присутствии  $H_4BATA$  показана на Рисунок 2. Комплексы  $Bi^{3+}$  с  $H_4BATA$  существуют в различных формах в широком диапазоне рН, при этом при рН 6 – 8 преобладает депротонированная форма комплекса.

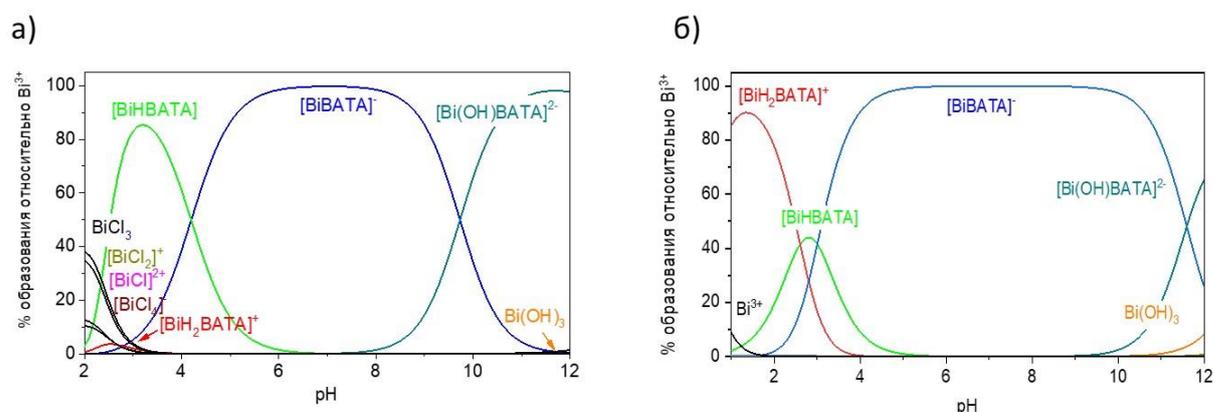


Рисунок 2. Диаграмма распределения форм комплекса  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  в зависимости от pH ( $c(\text{L}) = c(\text{Bi}) = 1 \text{ mM}$ ) а) в условиях проведения потенциометрического титрования, б) в отсутствие хлорид-ионов.

### Исследование структуры комплексов $\text{Bi}^{3+}$ , $\text{La}^{3+}$ и $\text{Ac}^{3+}$ с $\text{H}_4\text{BATA}$ .

В случае комплексов с лигандом  $\text{H}_4\text{BATA}$  не удалось получить монокристаллы комплексов. Поэтому моделирование геометрии комплексных соединений  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  и  $\text{Ac}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  проводилось путём оптимизации геометрии в программе ORCA методом теории функционала плотности (DFT).

Для всех трёх комплексов были установлены две конформации в растворе (Таблица 4). Полученные структуры отличаются расположением ацетатных координирующих групп относительно полости бензоазакраун-лиганда. Конформация 1 характеризуется координацией тремя ацетатными группами (O(4), O(6), O(8)) с одной стороны и четвёртой (O(10)) – с другой. В конформации 2 две ацетатные группы располагаются с одной стороны макроцикла (O(4), O(8)) и две (O(6), O(10)) – с другой (Рисунок 3).

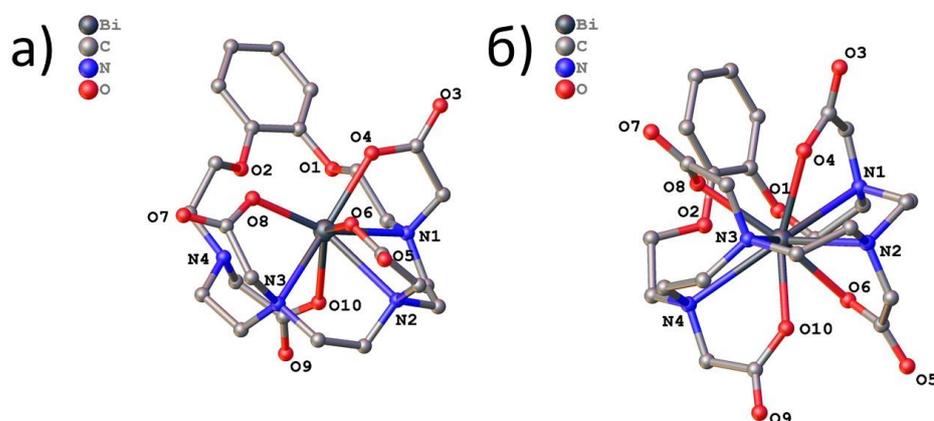


Рисунок 3. Оптимизированные структуры комплекса  $[\text{BiBATA}]$ : а) конформация 1; б) конформация 2.

Из-за заполнения координационной сферы четырьмя аминогруппами и четырьмя ацетатами, макроциклические атомы кислорода O(1) и O(2) удаляются от катиона металла на максимально возможное расстояние в полости - 4–5 Å в случае конформации 1 (Таблица 4). 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.

Таблица 4. Межатомные расстояния [Å]  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  и  $\text{Ac}^{3+}$  в координационном окружении их комплексов с  $\text{H}_4\text{BATA}$  согласно оптимизированным геометриям.

	$\text{Bi}^{3+}$		$\text{La}^{3+}$		$\text{Ac}^{3+}$	
	Конформация 1	Конформация 2	Конформация 1	Конформация 2	Конформация 1	Конформация 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

По сравнению с  $[\text{BiBATA}]^-$ , атомы кислорода макроцикла в  $[\text{LaBATA}]^-$  и  $[\text{AcBATA}]^-$  расположены ближе, и O(2) может участвовать в координации катиона внутри полости. В случае конформации 2 комплекса  $[\text{AcBATA}]^-$  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  $\text{Ac}^{3+}$  в комплексе. Также данный факт косвенно указывает на то, что достаточно крупная полость макроцикла 18-краун-6 (диаметр 2,6–3,2 Å) может больше подходить крупному трёхзарядному катиону  $\text{Ac}^{3+}$  (ионный радиус 1,12 Å, КЧ 6) для его эффективной координации с включением внутри полости макроцикла, по сравнению с катионами, обладающими меньшим ионным радиусом. В этом случае катион  $\text{Ac}^{3+}$  будет лучше экранирован от конкурирующих катионов или биологических молекул, что увеличивает кинетическую стабильность комплекса в организме.

Полученные структуры комплексов и длины связей можно сравнить с комплексами  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{La}^{3+}$  с известными лигандами, в частности, с  $\text{H}_4\text{DOTA}$ . Средние длины связей  $\text{La}^{3+}$  с ато-

мами азота макроцикла (2,738 Å) и с атомами кислорода боковых координирующих ацетатных групп (2,484 Å) [LaBATA]<sup>-</sup> практически идентичны длинам связей комплекса [LaDOTA]<sup>-</sup> (2,795 и 2,493 Å соответственно) с КЧ = 9 (Na[La(DOTA)La(HDOTA)]·10H<sub>2</sub>O)[6], поскольку H<sub>4</sub>DOTA имеет склонность к образованию девятикоординированных комплексов лантаноидов(III) с общей формулой [M(DOTA)(H<sub>2</sub>O)]<sup>-</sup>. Сходство пространственной координации комплекса, при котором катион металла включён в полость макроцикла и помимо атомов азота координируется также ацетатными группами по разные стороны макроцикла, может свидетельствовать о схожей кинетической стабильности комплексов катионов, схожих по ионному радиусу и степени окисления, в присутствии конкурирующих молекул (например, в сыворотке крови).

Структурные данные комплекса Bi<sup>3+</sup> с H<sub>4</sub>BATA, полученные методом DFT, подтверждаются анализом образцов при pH 5-5,0 методом спектроскопии протяжённой тонкой структуры рентгеновского поглощения (EXAFS). Также был проведён анализ образцов в широком диапазоне pH, что позволило подтвердить распределение форм комплекса от pH, полученное из констант устойчивости комплексов (Рисунок 4).

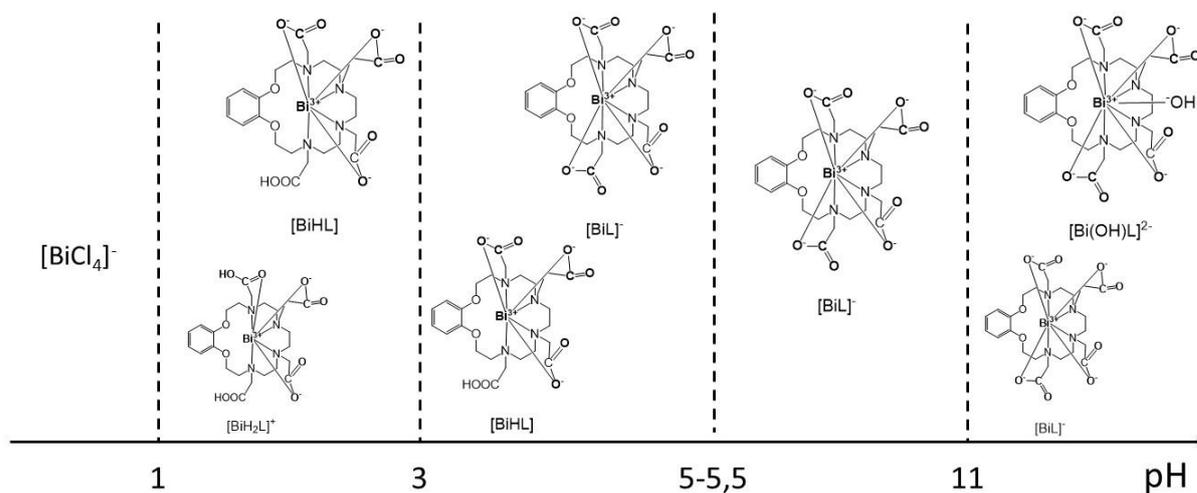


Рисунок 4. Предполагаемая координация Bi<sup>3+</sup> в комплексах с H<sub>4</sub>BATA в зависимости от pH.

### Синтез и определение радиохимической чистоты комплексов Bi<sup>3+</sup> и Ac<sup>3+</sup> с H<sub>4</sub>BATA

#### Синтез и определение РХЧ комплекса [<sup>207</sup>Bi]BiBATA<sup>-</sup>

Для получения радиофармпрепаратов важно, чтобы лиганд в составе конъюгата с биомолекулой быстро и с высоким выходом связывал радионуклид, желательно, в мягких условиях, чтобы можно было проводить мечение конъюгата радионуклидом напрямую и без разрушения биомолекулы. Эффективность связывания Bi<sup>3+</sup> в комплекс с H<sub>4</sub>BATA определяли при комнатной температуре и при 80°C, время выдержки составило 1 ч. В качестве

метки использовали радионуклид  $^{207}\text{Bi}$ , его количественное связывание с лигандом  $\text{H}_4\text{BATA}$  определяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). Радиохимическая чистота (РХЧ) комплекса  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  сразу после приготовления (через 2-3 мин) и после выдерживания в течение 1 ч при рН 6,1 и  $c_L = 1$  мкМ не зависела от температуры и составила: 44% при  $80^\circ\text{C}$  и 49% при  $25^\circ\text{C}$ . Известно, что низкая скорость комплексообразования  $\text{H}_4\text{DOTA}$  обусловлена медленным депротонированием атомов азота макроцикла с одновременным включением катиона металла в полость макроцикла. В случае  $\text{H}_4\text{BATA}$  быстрое комплексообразование обеспечивается за счёт большего размера и меньшей жесткости структуры макроцикла 18-краун-6 (2,6-3,2 Å)  $\text{H}_4\text{BATA}$  по сравнению с 12-краун-4 (1,2-1,5 Å)  $\text{H}_4\text{DOTA}$ . Поэтому депротонирование и включение металла в полость макроцикла в случае  $\text{H}_4\text{BATA}$  протекает быстрее, и все эксперименты по комплексообразованию проводились через 1-3 минуты после приготовления раствора при комнатной температуре.

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

С целью оценки эффективности связывания  $\text{Ac}^{3+}$  лигандом  $\text{H}_4\text{BATA}$  было проведено сравнение комплексообразования  $\text{Ac}^{3+}$  с лигандом  $\text{H}_4\text{DOTA}$ . Для этого был проведён эксперимент по оценке эффективности связывания  $^{228}\text{Ac}$  с обоими лигандами в одинаковых условиях методом ТСХ (Рисунок 5). Полученные данные позволяют сделать вывод, что  $\text{H}_4\text{BATA}$  обладает высокой скоростью связывания  $\text{Ac}^{3+}$  уже при комнатной температуре. При необходимости можно использовать нагревание для ещё более эффективного связывания катиона. Второй вывод заключается в том, что  $\text{H}_4\text{BATA}$  связывает  $\text{Ac}^{3+}$  при более низкой концентрации лиганда, чем  $\text{H}_4\text{DOTA}$ , и подобная тенденция сохраняется даже при высоких температурах, что согласуется с более высокими значениями констант устойчивости и  $\rho_{\text{Ac}}$  для формы комплекса  $[\text{AcBATA}]^-$  по сравнению с  $[\text{AcDOTA}]^-$ . Этот факт указывает на большее сродство большого катиона  $\text{Ac}^{3+}$  к лиганду  $\text{H}_4\text{BATA}$  с большей полостью макроцикла, чем у  $\text{H}_4\text{DOTA}$ .

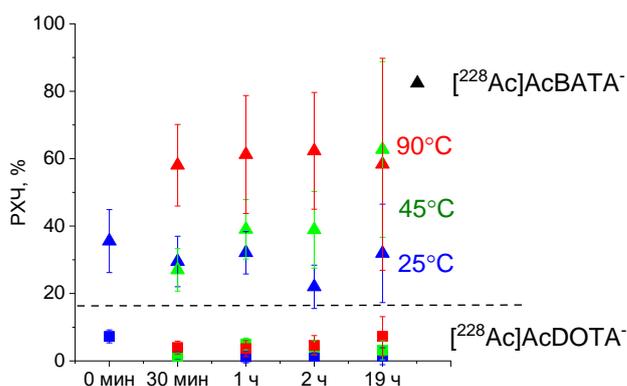


Рисунок 5. Радиохимическая чистота (РХЧ) комплексов  $\text{H}_4\text{DOTA}$  и  $\text{H}_4\text{BATA}$  ( $c_L = 2$  мкМ) с  $[\text{}^{228}\text{Ac}]\text{Ac}^{3+}$  при различных температурах и времени выдержки.

## Сравнение скорости образования и диссоциации комплекса $\text{Bi}^{3+}$ с $\text{H}_4\text{BATA}$ с типовыми комплексами. Определение механизма протон-ассоциированной диссоциации

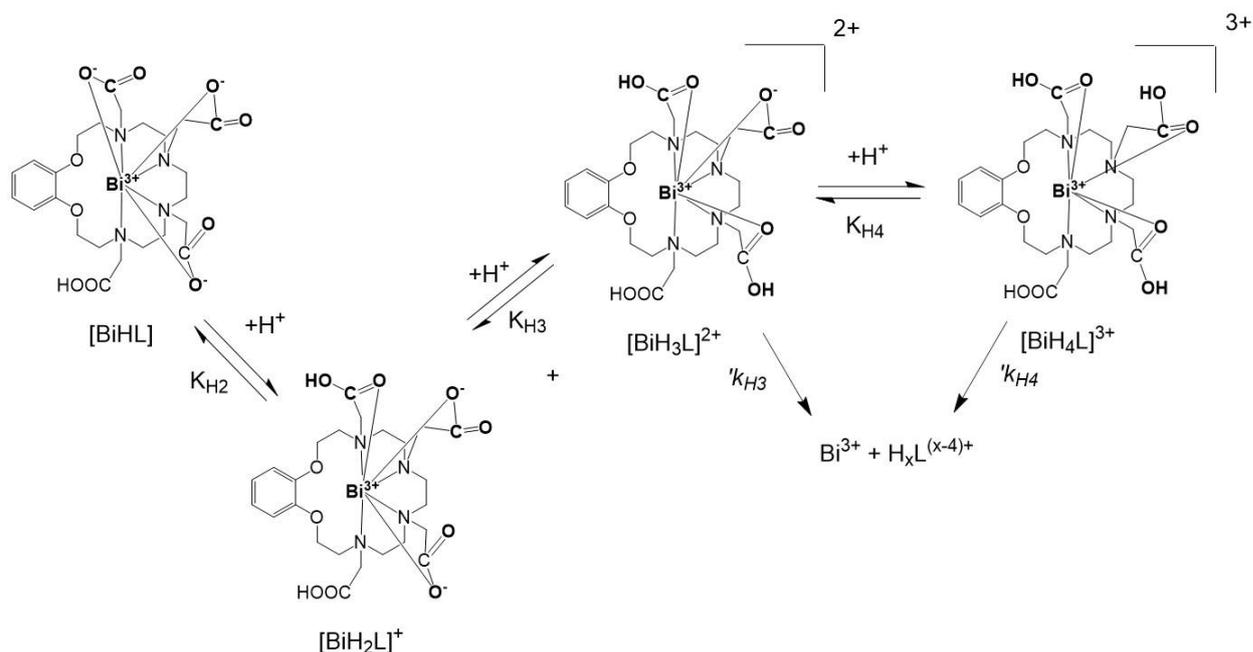
Кинетическая инертность комплекса также имеет решающее значение при создании радиофармпрепарата, поскольку важно гарантировать, что после введения в организм радионуклид не высвобождается и не оказывается в здоровых органах и тканях. Было проведено сравнение скорости комплексообразования и диссоциации  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$ ,  $\text{H}_4\text{DOTA}$  и ациклическим лигандом  $\text{H}_5\text{DTPA}$  в избытке  $\text{H}^+$  методом УФ-спектроскопии. При  $25^\circ\text{C}$  в  $0,1 \text{ M HCl}$  и 10-кратном избытке лиганда (для обеспечения условий реакции псевдопервого порядка) не наблюдалось образования комплекса  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{DOTA}$ . В то же время ациклический лиганд  $\text{H}_5\text{DTPA}$  связывал  $\text{Bi}^{3+}$  в первые секунды реакции, а  $\text{H}_4\text{BATA}$  – в течение нескольких минут, что указывает на более подвижную структуру  $\text{H}_4\text{BATA}$  по сравнению с более компактным макроциклом  $\text{H}_4\text{DOTA}$ . Процесс диссоциации был исследован для комплексов, синтезированных в соотношении 1:1, в  $0,1 \text{ M HCl}$ . В этих условиях не наблюдалось существенной диссоциации комплексов  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{DOTA}$  и  $\text{H}_5\text{DTPA}$ , в то время как комплекс с  $\text{H}_4\text{BATA}$  постепенно диссоциировал. Для понимания причин, почему наблюдается разница в скорости диссоциации при низких значениях pH было проведено детальное исследование кинетики протон-зависимой диссоциации комплекса  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$ .

### *Механизм протон-зависимой диссоциации комплекса $\text{Bi}^{3+}$ с $\text{H}_4\text{BATA}$*

Для определения механизма протон-зависимой диссоциации комплекса  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$ , исследовали кинетику диссоциации при  $25^\circ\text{C}$  в диапазоне концентраций  $\text{H}^+$   $0,01 - 0,30 \text{ M}$ . В диапазоне от  $0,01 \text{ M}$  до примерно  $0,05 \text{ M} [\text{H}^+]$  не наблюдалось существенного изменения спектра поглощения образцов, т.е. комплекс в растворе оставался устойчив. По-видимому, в этом диапазоне концентраций  $\text{H}^+$  преобладает устойчивая монопротонированная форма  $[\text{BiH}\text{BATA}]$ , в которой лишь одна карбоксильная группа является протонированной и практически не участвует в координировании катиона металла. При увеличении концентрации  $\text{H}^+$  ( $0,10 - 0,30 \text{ M} [\text{H}^+]$ ) происходила диссоциация комплекса, что обусловлено присутствием более высоко протонированных форм комплекса. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что формы  $[\text{BiH}\text{BATA}]$  и  $[\text{BiBATA}]^-$ , по-видимому, гораздо более устойчивы к протон-зависимой диссоциации по сравнению с  $[\text{BiH}_2\text{BATA}]^+$  из-за включения  $\text{Bi}^{3+}$  внутрь полости макроцикла и прочного удерживания катиона атомами азота макроцикла с образованием «внутриклеточный» («in-cage») комплекс. Был предложен механизм кислотной диссоциации комплекса  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  (схема 1). Первая стадия – быстрое протонирование координирующей  $\text{Bi}^{3+}$  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. Данный механизм диссоциации похож на механизм, присущий комплексам с  $H_4DOTA$  и  $DOTA$ -подобными лигандами.

Схема 1. Механизм протон-зависимой диссоциации комплекса  $Bi^{3+}$  с  $H_4BATA$  в  $0,10 - 0,30 M [H^+]$ .



\* Конкретные места протонирования не уточнены

#### Определение кинетической стабильности комплексов $H_4BATA$ с $Bi^{3+}$ и $Ac^{3+}$ в среде конкурентных катионов и в сыворотке крови

После того, как были получены данные, свидетельствующие о высокой термодинамической устойчивости комплексов  $H_4BATA$  с  $Bi^{3+}$  и  $Ac^{3+}$ , была проведена оценка кинетической стабильности данных комплексов *in vitro*. Для этого были приготовлены растворы соответствующих комплексных соединений  $Bi^{3+}$  и  $Ac^{3+}$ , при pH 6 в 0,01 M буфере MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота). В качестве удобных для работы радиоизотопов исследуемых катионов были выбраны <sup>207</sup>Bi и <sup>228</sup>Ac. Полученные комплексные соединения помещали в среду с конкурентными катионами или в эмбриональную бычью сыворотку крови и выдерживали при 37°C. Методом ТСХ было показано, что комплекс с  $Bi^{3+}$  оставался стабильным в изотоническом растворе (0,9% NaCl) и в избытке катионов микроэлементов  $Ca^{2+}$  (5 мМ),  $Mg^{2+}$  (5 мМ),  $Zn^{2+}$  (0,1 мМ) и  $Cu^{2+}$  (0,1 мМ) по крайней мере 2 дня. Этот комплекс, как и комплекс  $[BiDOTA]^-$ , остается стабильным в сыворотке крови в течение по крайней мере 2 дней. Следует отметить, что комплекс с ациклическим лигандом  $H_4EDTA$  диссоциирует на 50% всего лишь за 15 мин, и полностью диссоциирует в течение 1 ч.

Методом ТСХ была продемонстрирована кинетическая стабильность комплекса  $[\text{AcBATA}]^-$  по крайней мере в течение 1 дня в присутствии 50-кратного избытка по отношению к лиганду конкурирующего иона  $\text{La}^{3+}$ , что вновь указывает на высокое сродство  $\text{Ac}^{3+}$  к 18-краун-6 макроциклу  $\text{H}_4\text{BATA}$ . Также  $[\text{AcBATA}]^-$  был стабилен в сыворотке крови по крайней мере в течение 1 сут. Поскольку комплексы с  $\text{H}_4\text{BATA}$  продемонстрировали высокую кинетическую инертность *in vitro*, было целесообразно оценить их кинетическую инертность *in vivo*, исследовав распределение полученных комплексов в организме здоровых мышей.

### **Исследование биораспределения комплексов $\text{Bi}^{3+}$ и $\text{Ac}^{3+}$ с $\text{H}_4\text{BATA}$ в организме здоровых мышей**

Перед конъюгированием лиганда с биологическим вектором необходимо оценить кинетическую стабильность радиоактивного комплекса с лигандом *in vivo*, поскольку в случае диссоциации комплекса в тканях организма, нет необходимости в дальнейшем связывании лиганда с биомолекулой. Биораспределение комплексов  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Ac}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  было исследовано в организме здоровых мышей. Все эксперименты *in vivo* были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова. В экспериментах использовали  $n = 24$  самцов мышей линии C57bl/6 (на каждую временную точку  $n = 3$ ): мышей подвергали эвтаназии спустя 1 и 6 ч в случае соединений  $[\text{BiBATA}]^-$ ,  $[\text{BiDOTA}]^-$  и  $[\text{BiEDTA}]^-$  и спустя 6 ч в случае соединений  $[\text{AcBATA}]^-$  и  $\text{Ac}(\text{NO}_3)_3$ . В качестве радиоактивных меток использовали  $^{207}\text{Bi}$  и  $^{225}\text{Ac}$ . Инъекции объёмом 100 мкл вводили путём внутрибрюшинной инъекции в случае соединений с висмутом и внутривенной инъекции через хвостовую вену в случае соединений с актинием. Накопление в органах оценивалось путём определения процента введённой дозы на 1 г органа (% введ.д./г).

Из полученных данных (Рисунок 6) видно, что комплекс  $^{207}\text{Bi}[\text{BiBATA}]^-$  обладает весьма схожим профилем биораспределения и так же быстро выводится из организма спустя 6 ч, как и комплекс  $^{207}\text{Bi}[\text{BiDOTA}]^-$  и значительно отличается от распределения комплекса  $^{207}\text{Bi}[\text{BiEDTA}]^-$ , который нестабилен в сыворотке крови и, следовательно, в организме тоже. Ввиду неустойчивости  $^{207}\text{Bi}[\text{BiEDTA}]^-$ , свободный  $\text{Bi}^{3+}$  накапливался в организме (Рисунок 6). В случае  $^{207}\text{Bi}[\text{BiBATA}]^-$  максимальное накопление  $^{207}\text{Bi}$  наблюдали в почках: оно составило 3,03 % введ.д./г через 1 ч, и это значение снижалось до 2 % введ.д./г спустя 6 часов. Данный факт свидетельствует о преимущественном выведении комплекса посредством почек. Комплекс  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  демонстрирует такую же высокую кинетическую стабильность *in vivo*, как и комплекс с  $\text{H}_4\text{DOTA}$ .

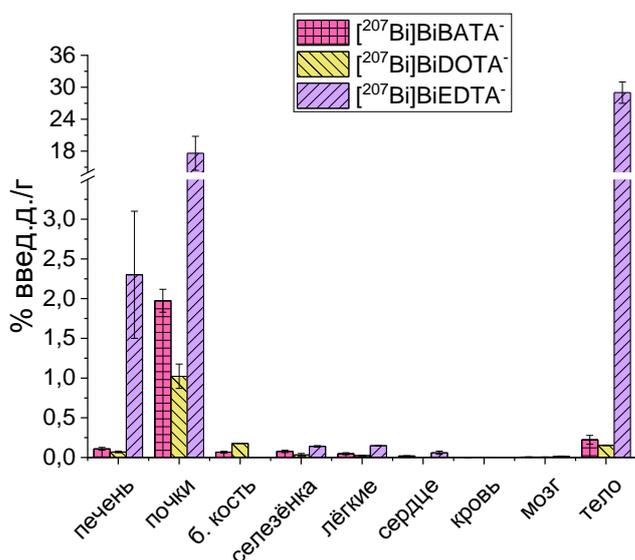


Рисунок 6. Распределение (% введ.д./г) комплексов [<sup>207</sup>Bi]BiEDTA<sup>-</sup>, [<sup>207</sup>Bi]BiDOTA<sup>-</sup> и [<sup>207</sup>Bi]BiBATA<sup>-</sup> в органах здоровых мышей спустя 6 ч после внутривенного введения.

При исследовании комплекса с As<sup>3+</sup>, было установлено, что профиль биораспределения [<sup>225</sup>Ac]AcBATA<sup>-</sup> значительно отличается от профиля [<sup>225</sup>Ac]Ac(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Рисунок 7). Во-первых, наблюдается крайне низкое накопление <sup>225</sup>Ac во всех органах, в том числе в печени (0,2 % введ.д./г), в которой наблюдалось наибольшее накопление <sup>225</sup>Ac в случае нитратной формы. Следовательно, комплекс [<sup>225</sup>Ac]AcBATA<sup>-</sup> стабилен *in vivo*. Во-вторых, [<sup>225</sup>Ac]AcBATA<sup>-</sup> практически полностью выводится из организма через 6 ч посредством почек. Согласно полученным результатам, можно предположить, что комплекс [AcBATA]<sup>-</sup> так же высоко стабилен, как и комплексы с другими макроциклическими лигандами: [AcDOTA]<sup>-</sup>, [Ac(macrota)]<sup>+</sup> и [AcHENA]<sup>3-</sup>, а краун-эфирная полость 18-краун-6 представляется более предпочтительной для такого крупного катиона, как As<sup>3+</sup>.

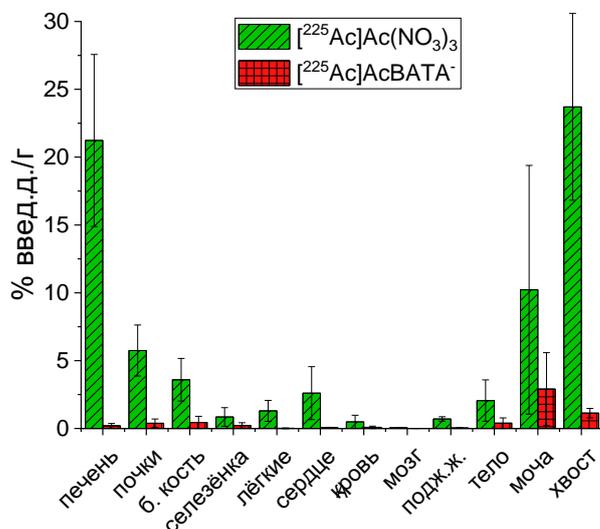


Рисунок 7. Распределение (% введ.д./г) [<sup>225</sup>Ac]Ac(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> и [<sup>225</sup>Ac]AcBATA<sup>-</sup> в органах здоровых мышей спустя 6 ч после внутривенного введения.

## ВЫВОДЫ

1. Комплекс  $[\text{BiBATA}]^-$  не уступает, а  $[\text{AcBATA}]^-$  превосходит соответствующие комплексы с  $\text{H}_4\text{DOTA}$  по термодинамическим параметрам, поскольку размер макроцикла 18-краун-6 более предпочтителен для таких крупных катионов как  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Ac}^{3+}$  для образования устойчивого внутрисферного комплекса;
2. Показано, что комплексы  $\text{Bi}^{3+}$  и  $\text{Ac}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  образуются уже при комнатной температуре ( $25^\circ\text{C}$ ) с высокой скоростью (в течение 1-3 мин), что обусловлено подвижностью структуры макроцикла 18-краун-6;
3. Установлено, что лиганд  $\text{H}_4\text{BATA}$  быстро связывает катион  $\text{Bi}^{3+}$  даже при низких значениях pH ( $\text{pH} < 1$ ) уже при комнатной температуре аналогично  $\text{H}_5\text{DTPA}$ . В то же время, комплекс легко протонируется из-за высокого сродства протонов к лиганду  $\text{H}_4\text{BATA}$  по механизму, схожему с  $\text{H}_4\text{DOTA}$  и её аналогами;
4. Высокая кинетическая стабильность комплекса  $\text{Bi}^{3+}$  с  $\text{H}_4\text{BATA}$  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.

### Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включённых в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of science, Scopus:

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 // Medicinal Chemistry Communications. 2019. Vol. 10, № 9. P. 1641–1645. DOI: 10.1039/c9md00251k (Scopus, WoS, IF: 4,1; 1,4 п.л./60 %)
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. DOI: 10.1002/ejic.202100256 (Scopus, WoS, IF: 2,3; 3,5 п.л./50 %)
3. E.V. Matazova, B.V. Egorova, A.D. Zubenko, A.V. Pashanova, O.A. Fedorova, S.N. Kalmykov. Thermodynamic and kinetic features of  $\text{Bi}^{3+}$  complexes with aza-macrocycles  $\text{H}_4\text{BATA}$

and H<sub>4</sub>DOTA // ChemistrySelect. 2022. Vol. 7, №44. P. e202203108. DOI: 10.1002/slct.202203108 (Scopus, WoS, IF: 2,1; 2,5 п.л./70 %)

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. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.3c00314 (Scopus, WoS, IF: 4,6; 4,3 п.л./50 %).

#### **Прочие публикации:**

5. E.V. Matazova, B.V. Egorova, E.A. Konopkina, G.Yu. Aleshin, A.D. Zubenko, A.V. Pashanova, O.A. Fedorova, S.N. Kalmykov. Complex of Bi<sup>3+</sup> and new aza-crown ligand: fast formation and high stability // тезисы конференции «International Symposium on Metal Complexes (ISMEC) 2019». Москва, Россия, 2019, С. 28.

6. Е.В. Матазова, Б.В. Егорова, А.В. Пашанова, Г.Ю. Алёшин, А.Д. Зубенко, Е.А. Конопкина. Эффективный бензоазакраун-лиганд для связывания висмута // тезисы конференции «III Международная научно-практическая конференция "Радиофарма-2019" Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов». Москва, Россия, 2019, С. 47.

7. Е.В. Матазова, Б.В. Егорова, Г.Ю. Алёшин, А.В. Пашанова, Е.А. Конопкина, Н.А. Титченко, А.Д. Зубенко. Получение и сравнение устойчивости комплексов Bi<sup>3+</sup> и Sc<sup>3+</sup> с бензоазакраун-лигандом и их конъюгатов с октреотидом как потенциальных РФП // тезисы в сборнике «III Объединённый научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов; VII Съезд биохимиков России; X Российский симпозиум «Белки и пептиды»; VII Съезд физиологов СНГ. Научные труды». Москва, Россия, 2021, Т. 2, С. 279.

8. Е.В. Матазова, А.В. Пашанова. Термодинамические и кинетические характеристики комплексообразования азакраун-лиганда BATA с Bi<sup>3+</sup>, Sc<sup>3+</sup> и Ac<sup>3+</sup> // конференция «XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2022"». Москва, Россия, 2022.

9. Е.В. Матазова, Б.В. Егорова, А.В. Пашанова, А.Д. Зубенко, Г.Ю. Алёшин, А.А. Митрофанов, С.В. Ермолаев, А.Н. Васильев, О.А. Фёдорова, С.Н. Калмыков. Комплекс бензоазакраун-лиганда H<sub>4</sub>BATA с актинием(III) как альтернатива комплексу с H<sub>4</sub>DOTA: от термодинамической устойчивости к устойчивости *in vivo* // тезисы конференции «Радиохимия 2022». Санкт-Петербург, Россия, 2022, С. 511.

10. E.V. Matazova, B.V. Egorova, A.V. Pashanova, A.D. Zubenko, A.A. Mitrofanov, O.A. Federova, S.V. Ermolaev, A.N. Vasiliev, S.N. Kalmykov // статья в сборнике «Abstracts from

the 20th European symposium on radiopharmacy and radiopharmaceuticals». EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry. 2023. Vol. 8. P. OP11.

#### **Список цитируемой литературы**

1. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA). [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/drug-approvals-and-databases>.

2. 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). С. 987–991.

3. Kannengießner 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.

4. 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). С. 958–960.

5. Csajbo É., Baranyai Z., Bányai I., Brücher E., Király R., Müller-Farnow A., Platzek J., Radüchel B., Schäfer M. Equilibrium, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy, and X-ray Diffraction Studies on the Complexes Bi(DOTA)<sup>-</sup> and Bi(DO3A-Bu) // *Inorganic Chemistry*. 2003. № 7(42). С. 2342–2349.

6. Aime S., Barge A., Benetollo F., Bombieri G., Botta M., Uggeri F. A Novel Compound in the Lanthanide(III) DOTA Series. X-Ray Crystal and Molecular Structure of the Complex Na[La(DOTA)La(HDOTA)]·10H<sub>2</sub>O // *Inorganic Chemistry*. 1997. № 19(36). С. 4287–4289.

## 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 РФФИ №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.