

На правах рукописи

ЕГОРОВА БАЙИРТА ВЛАДИМИРОВНА

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ As^{3+} , Eu^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} ПИРИДИН- И
ФЕНИЛ-СОДЕРЖАЩИМИ АЗАКРАУН-ЭФИРАМИ**

Специальность 02.00.14 – радиохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва

2016

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:

Калмыков Степан Николаевич,

доктор химических наук, заведующий кафедрой радиохимии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Официальные оппоненты:

Эпштейн Наталья Борисовна,

доктор фармацевтических наук, доцент, заведующая кафедрой фармацевтической и радиофармацевтической химии Обнинского института атомной энергетики Национального исследовательского ядерного университета МИФИ

Красикова Раиса Николаевна,

кандидат химических наук, заведующая лабораторией радиохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук

Ведущая организация:

Акционерное общество «Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский физико-химический институт имени Л. Я. Карпова» в г. Обнинск

Защита диссертации состоится «19» января 2017 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.42 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.10, кафедра радиохимии, аудитория 308.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова и на сайте химического факультета <http://www.chem.msu.ru/>.

Автореферат разослан « » ноября 2016 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.001.42,

кандидат химических наук



Северин Александр Валерьевич

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Фотонное излучение, сопровождающее различные виды радиоактивного распада, дает возможность визуализации расположения поражённых тканей (даже при отсутствии структурных изменений, то есть на начальной стадии) и нарушения физиологических обменных процессов. Соответствующие методы однофотонной компьютерной эмиссионной томографии (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) стали рутинными в медицинской диагностической практике. Для терапии раковых заболеваний используются корпускулярные излучения: альфа-, бета- частицы, электроны конверсии и Оже. Отличительной особенностью такого излучения по сравнению с рентгеновским и гамма-излучением является более высокая линейная передача энергии, которая обеспечивает множественные нерепарируемые разрывы ДНК, что приводит к гибели клеток.

В настоящее время активно исследуется применение многих радионуклидов металлов ($^{64,67}\text{Cu}$, $^{88,90}\text{Y}$, ^{89}Zr , ^{212}Pb , ^{177}Lu , $^{212,213}\text{Bi}$, ^{225}Ac и др.) с точки зрения расширения возможностей диагностики терапии процессов с различной фармакинетикой. Кроме того, открываются возможности тераностики социально-значимых заболеваний: либо используя радионуклиды с различными типами излучений (например, в случае ^{177}Lu β^- -излучение используется для терапии, а γ -излучение для ОФЭКТ), либо изотопы одного элемента (^{64}Cu для ПЭТ, а ^{67}Cu для терапии). В связи с чем эти радионуклиды будут играть играют всё большую роль, как в диагностике, так и терапии.

Возможности как молекулярной визуализации, так и терапии онкологических заболеваний, основаны на адресной доставке радионуклида к поражённой ткани, что может быть достигнуто конъюгированием радионуклида к биологическим векторам - антителам, пептидам, модульным нанотранспортерам и пр., имеющим средство к таким клеткам. Однако связывание радионуклидов металлов с векторами напрямую не обеспечивает стабильного в биологических средах соединения, в связи с чем в структуре радиофармпрепаратов (РФП) необходимо наличие бифункционального хелатора (БФХ). Он, с одной стороны, должен обладать возможностью ковалентного связывания с биологической молекулой, а с другой, образовывать устойчивое комплексное соединение с катионом. Поиск таких молекул обусловлен координационными свойствами катионов, степенью окисления и Пирсоновской жёсткостью, а также наличием донорных атомов кислорода, азота и др. в структуре лиганда. В настоящее

время нашли применение лиганды на основе H_4DOTA и H_5DTPA (рис. 1). Однако, несмотря на высокую термодинамическую

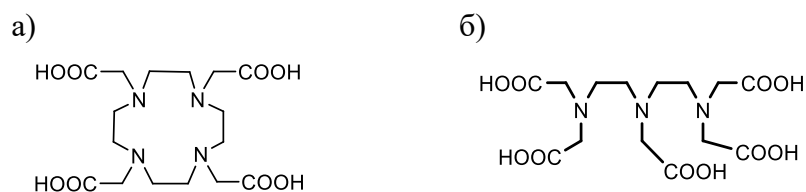


Рис. 1. Формулы H_4DOTA (а) и H_5DTPA (б).

устойчивость, комплексообразование с макроциклическими лигандами требует либо повышенных температур, что чаще всего не приемлемо для биологических векторов, либо продолжительного времени реакции, что приводит к значительным потерям за счёт радиоактивного распада (например, $T_{1/2}({}^{212}\text{Bi})=60,6$ мин, $T_{1/2}({}^{213}\text{Bi})=45$ мин), а скорость диссоциации комплексов с ациклическими лигандами *in vivo* приводит к накоплению диссоциированных катионов в здоровых тканях (печени, почках, костях).

Целью данной работы является поиск эффективных лигандов для радионуклидов медицинского назначения (${}^{64,67}\text{Cu}$, ${}^{212}\text{Pb}$, ${}^{225}\text{Ac}$, ${}^{213}\text{Bi}$, ${}^{90}\text{Y}$, ${}^{177}\text{Lu}$) на основе арил-содержащих аза-краун эфиров и установление закономерностей образования соответствующих комплексных соединений и их структуры. Так как все рассматриваемые в данной работе лиганды получены впервые и ранее не исследовались, то в рамках работы решались следующие **задачи**:

- Определение констант протонирования новых азакраун-эфиров методом потенциометрического титрования;
- Исследование комплексообразования Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ac^{3+} , Bi^{3+} , Eu^{3+} , Y^{3+} , Lu^{3+} с новыми азакраун-эфирами методами потенциометрического титрования и конкурирующих реакций осаждения, сорбции и экстракции с использованием радиоактивных меток;
- Исследование структуры комплексных соединений с использованием методов лазерной флуоресценции с временным разрешением (TRLIFS), спектроскопии протяжённой тонкой структуры рентгеновского поглощения (EXAFS) и квантово-химических расчётов;
- Установление закономерности строения – комплексообразующие свойства для ряда азакраун-эфиров;
- Оценка радиационной устойчивости и цитотоксичности наиболее эффективных арил-содержащих азакраун-эфиров по отношению к раковым клеткам и клеткам здоровых доноров;

Научная новизна работы заключается в следующих положениях, выносимых на защиту:

- Впервые проведено систематическое исследование новых арил-содержащих азакраун-эфиров и их комплексообразующих свойств по отношению к ряду трёх- и двухвалентных катионов радионуклидов медицинского назначения; показано, что наличие и число карбоксильных групп определяют образование комплексов и величину константы устойчивости комплексных соединений;
- Установлена прямая пропорциональность между протонированием новых азакраун-эфиров и константами образования комплексов с изученными катионами; было выявлено, что коэффициенты пропорциональности соответствуют «жесткости» катионов, а сама корреляция может быть использована для прогнозирования комплексообразующих свойств новых азакраун-эфиров;

- Показана радиационная устойчивость арил-содержащих азакраун-эфиров;
- Определены полулетальные концентрации арил-содержащих азакраун-эфиров по отношению как к раковым, так и здоровым клеткам крови.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Установленная в данной работе корреляция между протонированием лигандов и константами устойчивости комплексов с Cu^{2+} , Pb^{2+} и Bi^{3+} может быть использована для прогнозирования констант комплексообразования с Cu^{2+} , Pb^{2+} и Bi^{3+} при последующих поисковых исследованиях новых бифункциональных хелаторов.

Арил-содержащие азакраун-эфирные комплексы непригодны для использования в качестве хелаторов «жестких» катионов редкоземельных элементов (РЗЭ).

Арил-содержащие азакраун-эфирные комплексы с 5 и 6 гетероатомами в макроцикле образуют комплексы с катионами в течение одной минуты при комнатной температуре, а образуемые комплексы стабильны *in vivo*, по крайней мере, в течение 3-х суток.

Личный вклад автора состоит в критическом обзоре литературных данных; потенциометрическом титровании всех лигандов и их комплексов с катионами металлов; определении констант устойчивости комплексов с катионами висмута и актиния методом конкурирующих реакций, определении устойчивости комплексов методом ТСХ, в т.ч. разработке соответствующих методик, проведении, обработке и интерпретации данных экспериментов по цитотоксичности; приготовлении образцов, анализе и обработке экспериментальных данных TRLIFS, EXAFS и масс-спектрометрии (с ионизацией в электроспрее – ESIMS – и матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией – МАЛДИ MS); 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: Первый Российско-Североевропейский Симпозиум по Радиохимии (RNSR-2013) 2013, Москва, Россия; Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia), 2013, Москва, Россия; 17-ая Радиохимическая конференция (RadChem), 2014, Марианске Лазне, Чехия; 9-ый Симпозиум по Мишенной Альфа-Терапии, 2015, Варшава, Польша; «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов» (Радиофарма-2015), 2015, Москва, Россия; VIII Всероссийская конференция по радиохимии «Радиохимия-2015», 2015, Железногорск, Россия; X Конференция молодых ученых, аспирантов и студентов ИФХЭ РАН «Физикохимия – 2015», 2015, Москва, Россия; 9-ая Международная конференция по ядерной химии и радиохимии (NRC9), 2016, Хельсинки, Финляндия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №№13-03-01304_а, 16-33-00642_мол_а и программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

Всего по материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ: из них 3 статьи (2 из которых входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК) и 8 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций.

Структура и объём работы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, иллюстрирована 59 рисунками и 15 таблицами. Список цитируемой литературы содержит 202 ссылки. Диссертация состоит из введения, трёх глав обзора литературы, экспериментальной части, шести глав результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложения.

Основное содержание работы

Во введении кратко обоснованы актуальность работы, сформулированы цель и задачи, а также новизна и практическая значимость работы. В первой главе обзора литературы рассмотрены свойства некоторых радионуклидов, применяемых в настоящее время или перспективных для применения в ПЭТ, ОФЭКТ или радионуклидной терапии. Во второй главе приведены сведения об основных лигандах, которые используются для связывания рассмотренных радионуклидов, как макроциклические, так и ациклические, а также рассмотрены функционализированные производные наиболее распространённых лигандов. В экспериментальной части описаны материалы, методики приготовления рабочих растворов, в том числе радионуклидов, методики проведения всех экспериментов. Представлены исследуемые лиганды (рис. 2), синтезированные в ИНЭОС РАН (лаб. фотоактивных супрамолекулярных систем, рук. д.х.н., проф. Фёдорова О.А.), описаны методы их характеристики: потенциметрическое титрование лигандов и их комплексов с Cu^{2+} , Pb^{2+} , Y^{3+} , Lu^{3+} , Eu^{3+} , определения констант устойчивости комплексов с Bi^{3+} и Ac^{3+} с

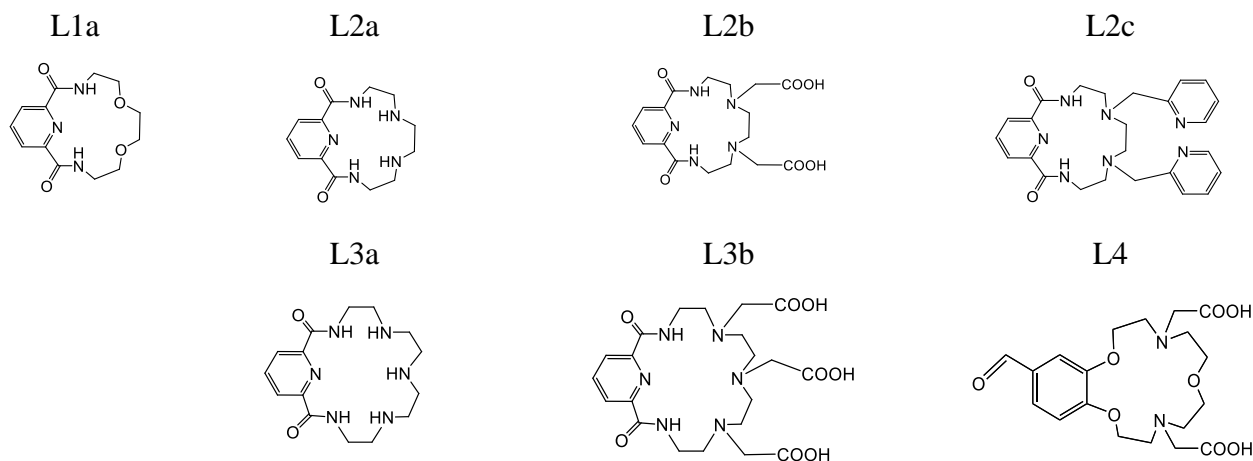


Рис. 2. Исследованные в данной работе лиганды.

использованием радионуклидов ^{207}Bi и ^{225}Ac , спектроскопия поглощения в УФ-видимом диапазоне, EXAFS, TRLIFS, тесты наиболее перспективных из исследованных лигандов на цитотоксичность по отношению к раковым и здоровым клеткам крови, а также исследование радиационной стойкости соединений. В следующем разделе представлены результаты и их обсуждение.

1 Исследование протонирования лигандов

В данной работе рассмотрена серия азакраун-эфиров, содержащих ароматические фрагменты: пиридин и фенил в макроциклической полости – с разным содержанием донорных атомов, как в макроцикле, так и в качестве «подвесных» групп.

Результаты потенциометрического титрования лигандов (табл. 1) показывают, что представленный ряд краун-эфиров характеризуется широким диапазоном констант протонирования.

Таблица 1 – Значения констант протонирования лигандов

реакция	L1a	L2a	L2b	L2c	L3a	L3b	L4
$\lg K_{1H} \quad \text{H}^+ + \text{L} \rightleftharpoons (\text{H}^+)\text{L}$	1,9±0,1	8,2±0,1	9,2±0,1	6,5±0,1	8,6±0,4	9,9±0,1	7,8±0,1
$\lg K_{2H} \quad 2\text{H}^+ + \text{L} \rightleftharpoons (\text{H}^+)_2\text{L}$	-	11,8±0,1	12,8±0,1	9,3±0,1	15,4±0,6	16,7±0,2	15,3±0,1
$\lg K_{3H} \quad 3\text{H}^+ + \text{L} \rightleftharpoons (\text{H}^+)_3\text{L}$	-	-	15,1±0,1	11,4±0,1	-	19,5±0,2	17,4±0,1
$\lg K_{4H} \quad 4\text{H}^+ + \text{L} \rightleftharpoons (\text{H}^+)_4\text{L}$	-	-	-	-	-	22,4±0,2	-

2 Комплексообразование лигандов с катионами Cu^{2+} , Pb^{2+} .

Для исследования образования комплексов с Cu^{2+} и Pb^{2+} был использован метод потенциометрического титрования. Из кривых титрования с помощью программы Hyperquad рассчитывали константы устойчивости комплексов. Программа Hyperquad основана на математическом моделировании кривой титрования с учётом ранее рассчитанных констант протонирования лигандов (табл. 1), известных из литературы констант гидролиза катионов, ионного произведения воды. Среди рассмотренных лигандов только для L1a не наблюдалось образования комплексов с Cu^{2+} и Pb^{2+} , что обусловлено наличием в структуре только слабоосновного пиридинового центра связывания. Для всех остальных лигандов наблюдалось образование комплексов с соотношением M:L=1:1. С повышением pH происходит образование тройных комплексов состава $\text{ML}(\text{OH})_m$ (табл. 2). Лиганды с большими макроциклами, L3a и L3b, образуют комплексы с Cu^{2+} и Pb^{2+} даже в монопротонированной форме.

Таблица 2 – Константы устойчивости комплексов L2, L3, L4 с Cu^{2+} , Pb^{2+}

M^{2+}	Стехиометрия комплекса	$\lg K$					
		L2a	L2b	L2c	L3a	L3b	L4
Cu^{2+}	$\text{L}:\text{Cu}^{2+}:\text{OH}^-$	5,4±0,2	6,2±0,1	4,8±0,1	5,7±0,5	9,8±0,1	7,7±0,2
	$\text{L}:\text{Cu}^{2+}$	8,8±0,2	11,2±0,1	8,9±0,1	10,8±0,6	15,8±0,1	14,4±0,1
	$\text{L}:\text{H}^+:\text{Cu}^{2+}$	-	-	-	15,4±0,4	-	-
Pb^{2+}	$\text{L}:\text{Pb}^{2+}:\text{OH}^-$	-2,1±0,1	1,53±0,19	-2,3±0,2	-2,8±0,1	2,5±0,1	0,3±0,1
	$\text{L}:\text{Pb}^{2+}$	-	8,7±0,1	4,9±0,1	4,9±0,1	14,1±0,1	11,6±0,1
	$\text{L}:\text{H}^+:\text{Pb}^{2+}$	-	-	-	-	17,2±0,1	-

Увеличение числа донорных атомов азота в макроцикле L3a по отношению к L1a и L2a приводит к повышению устойчивости комплексов, что видно на примере комплексов Cu^{2+} и Pb^{2+} с L3a. В качестве сравнения, для L2a существуют только гидроксидные формы комплекса PbL2a . Введение карбоксильных групп в молекулу лиганда значительно повышает устойчивость комплексных соединений с обоими катионами. Этот эффект сильнее выражен для Pb^{2+} , который является промежуточным в теории Пирсона. Для более «мягкого» катиона Cu^{2+} две карбоксильные группы в L2b приводят к повышению на 2 порядка устойчивости комплекса относительно L2a. К такому же увеличению устойчивости приводит введение дополнительного алифатического атома азота в макроцикл: $\lg K_{\text{CuL2b}} \approx \lg K_{\text{CuL3a}}$.

Дополнительные α -метилпиридиновые фрагменты в L2c не оказали влияния на суммарное протонирование лиганда по сравнению с L2a (табл. 1) и не повлияли на константу устойчивости комплексов с медью: $\lg K_{\text{CuL2c}} \approx \lg K_{\text{CuL2a}} = 8,9$. Однако Pb^{2+} образует с L2c комплекс близкой с PbL3a устойчивости, что может быть обусловлено большим насыщением координационной сферы Pb^{2+} донорными центрами лиганда L2c, так же как L2b и L3a по сравнению с L2a. Гораздо большая устойчивость комплексов Cu^{2+} с L2a и L3a по сравнению с Pb^{2+} ($R_i = 1,19 \text{ \AA}$ КЧБ [1]) может быть обусловлена включением катиона Cu^{2+} с меньшим радиусом ($R_i = 0,73 \text{ \AA}$ КЧБ [1]) в полость макроцикла и образованию плоского комплекса – одной из предпочтительных координаций для Cu^{2+} [2].

Лиганд L3b образует наиболее устойчивые комплексы среди рассмотренных лигандов (табл. 2), при этом комплексообразование происходит уже при низких значениях pH. Построенное согласно рассчитанным константам распределение форм Pb^{2+} (рис. 3) показывает, что комплекс PbL^- является доминирующим в широком диапазоне значений pH 4-10 (аналогично для Cu^{2+}), а в области низких значений pH комплекс PbL^- протонируется до электронейтрального PbHL .

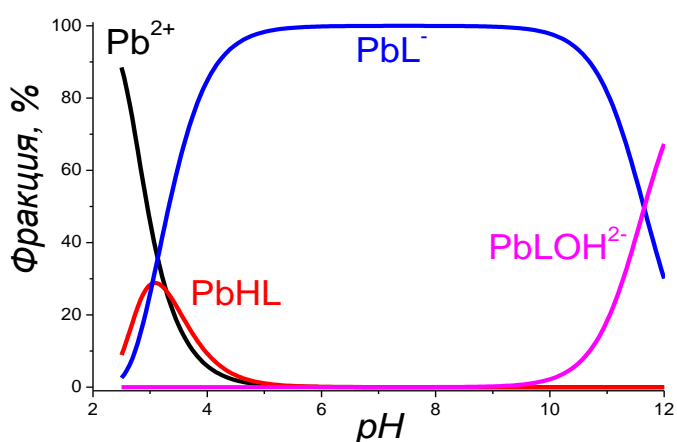


Рис. 3. Распределение химических форм свинца в комплексах с L3b в зависимости от pH.

Линейное соотношение свободных энергий (ЛССЭ) реакций комплексообразования и протонирования лигандов для макроциклических лигандов (рис. 4) хорошо описывается прямой для Cu^{2+} и Pb^{2+} . Повышенные значения $\lg K$ для комплексов с ЭДТА (приведены для сравнения с макроциклическими лигандами) показывают влияние числа карбоксильных групп и нежесткого каркаса ациклического хелатора на устойчивость образуемых комплексов, несмотря на равные значения суммарных констант протонирования ($\sum pK_a$)

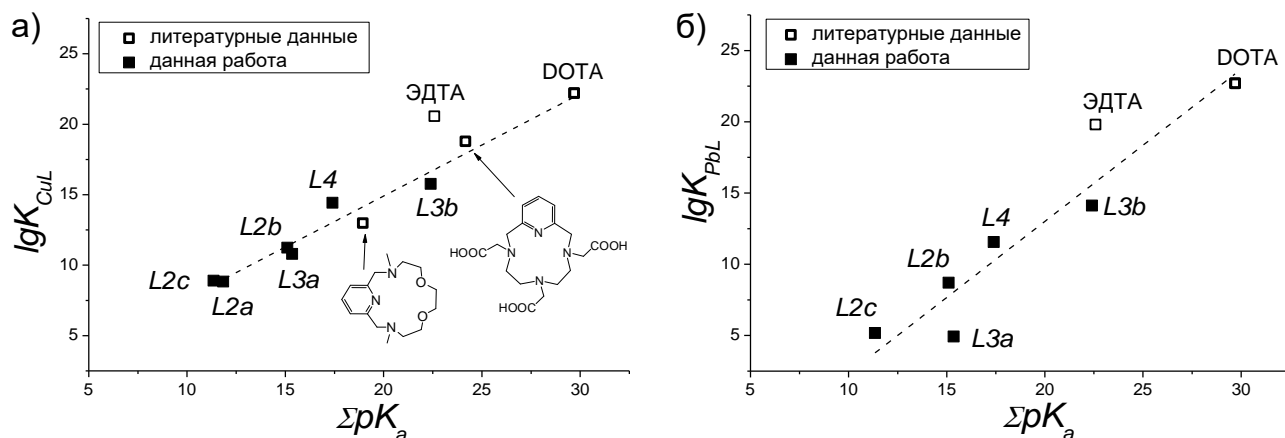


Рис. 4. ЛССЭ реакций комплексообразования и протонирования для Cu^{2+} (а) и Pb^{2+} (б).

ЭДТА и L3b. Наклоны корреляционных зависимостей, представленных на рис. 4, составляют $0,7 \pm 0,1$ (Cu^{2+}) и $1,1 \pm 0,1$ (Pb^{2+}), что свидетельствуют о том, что факторы (донорные атомы, заместители), влияющие на кислотность, определяют в равной степени комплексообразующие свойства по отношению к Pb^{2+} и в меньшей мере для Cu^{2+} , что может быть как раз обусловлено жёсткостью катионов: $I_A(\text{Cu}^{2+}) < I_A(\text{H}^+) < I_A(\text{Pb}^{2+})$ [2].

3 Комплексообразование с Y^{3+} , La^{3+} , Eu^{3+} , Lu^{3+} , Ac^{3+} , Bi^{3+} .

Было установлено, что среди рассматриваемых лигандов катионы РЗЭ образуют комплексы только с лигандами, обладающими карбоксильными группами, что связано с их большей «жёсткостью». Вследствие комплексообразования кривые потенциометрического титрования лигандов L2b, L3b, L4 при добавлении катионов Y^{3+} , La^{3+} и Lu^{3+} изменяются. В случае L3b при $\text{pH} > 6-7$ нерастворимый осадок гидроксидов РЗЭ не образуется, причём этот лиганд L3b образует наиболее устойчивые комплексы с РЗЭ среди исследованных (табл. 3).

Таблица 3 – Константы устойчивости комплексов L2b, L3b, L4 с катионами РЗЭ, рассчитанные из результатов потенциометрического титрования

Катион	Стехиометрия комплекса	lgK		
		L2b	L3b	L4
Y^{3+}	L: $\text{Y}^{3+}:\text{OH}^-$	-	$0,5 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,1$
	L: Y^{3+}	$5,5 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,1$
Eu^{3+}	L: $\text{Eu}^{3+}:\text{OH}^-$	-	$2,3 \pm 0,1$	-
	L: Eu^{3+}	$7,8 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,1$
La^{3+}	L: $\text{La}^{3+}:\text{OH}^-$	-	$-2,1 \pm 0,2$	$10,3 \pm 0,1$
	L: La^{3+}	-	$6,8 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,1$
Lu^{3+}	L: $\text{Lu}^{3+}:\text{OH}^-$	-	$0,5 \pm 0,1$	-
	L: Lu^{3+}	$6,2 \pm 0,3$	$7,2 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,1$

Исследование комплексообразования азкараун-эфиров с Ac^{3+} (ввиду его радиоактивности) и Bi^{3+} (ввиду его легкогидролизуемого характера) проводили с помощью метода конкурирующих реакций сорбции, экстракции или осаждения несвязанного в комплекс катиона. Радиоактивность $^{225}\text{Ac}^{3+}$ определяли методом гамма-спектрометрии по излучению дочерних радионуклидов ^{221}Fr и ^{213}Bi после установления радиоактивного равновесия. Концентрацию Bi^{3+} контролировали с помощью радиоактивной метки ^{207}Bi . Для

сравнения с результатами потенциометрического титрования аналогично определяли константы устойчивости с Y^{3+} и Eu^{3+} с использованием меток ^{90}Y и ^{152}Eu . Эксперименты по сорбции катионов Y^{3+} , Eu^{3+} и Ac^{3+} на SiO_2 показали, что при увеличении концентрации лиганда в растворе концентрация сорбированного катиона уменьшается (рис. 5а). Последнее связано с образованием комплексов ML_n в растворе. Изменение коэффициента распределения в присутствии лиганда позволяет рассчитать стехиометрию и константы устойчивости из зависимости $\lg\left(\frac{D_0}{D}-1\right)$ от $\lg c(L)$, где D_0 – коэффициент распределения катиона в отсутствие лиганда, а D – коэффициент распределения в присутствии лиганда, $c(L)$ – общая концентрация лиганда.

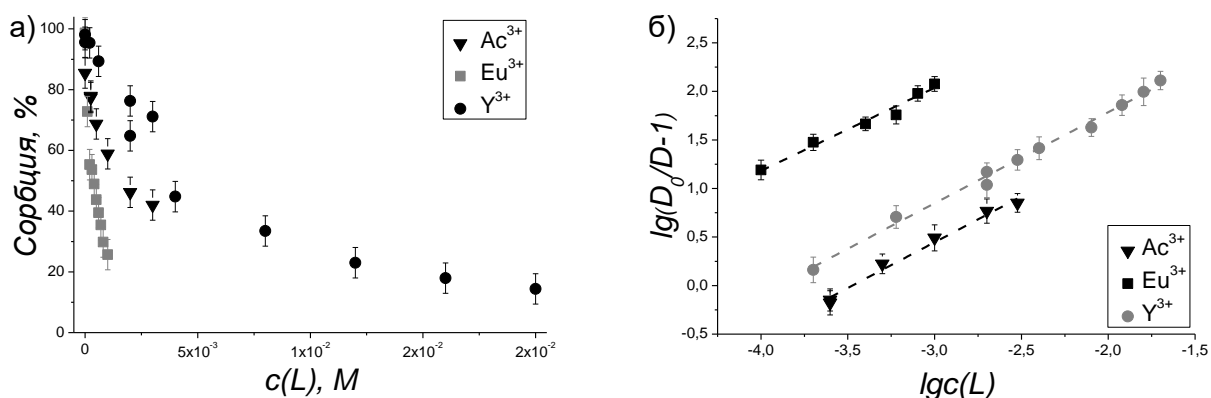


Рис. 5. Изменение сорбции (а) и коэффициента распределения (б) катионов Y^{3+} , Eu^{3+} и Ac^{3+} на силикагеле 0,3г/мл в зависимости от концентрации лиганда L4 в растворе.

Экспериментальные значения описываются линейной зависимостью с наклонами, близкими к 1 (рис. 5б, табл. 4), что соответствует образованию комплексов состава 1:1 и хорошо согласуется с результатами потенциометрического титрования. Рассчитанные значения логарифмов констант устойчивости приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Константы устойчивости комплексов Ac^{3+} с L2b, L3b и L4, определённые методом конкурирующей реакции сорбции на SiO_2

комплекс	n	$\lg K_{ML}$
L2b:Ac³⁺	0,86±0,06	5,7±0,1
L3b:Ac³⁺	0,81±0,12	7,4±0,1
L4:Ac³⁺	0,94±0,05	5,8±0,1

Видно, что полученные при различных значениях pH величины констант устойчивости комплекса $AcL2b$ в пределах погрешности не отличаются от $AcL4$, в то время как для $AcL3b$ наблюдается значительное повышение устойчивости (табл. 3).

Согласно рассчитанным значениям констант устойчивости комплексов, $P3Э^{3+}$ и Ac^{3+} образуют с рассмотренной серией азакраун-эфиров устойчивые комплексы, при этом значения различаются в пределах 1-2 порядков величины, что согласуется со схожестью химических свойств $P3Э$ и Ac^{3+} (табл. 3, 4). Однако видно, что комплексы с Eu^{3+} (представитель средней групп $P3Э$) для всех лигандов более устойчивы, чем с остальными

РЗЭ лёгкой (La^{3+}) и тяжёлой (Y^{3+} , Lu^{3+}) групп РЗЭ и Ac^{3+} . Аналогичная ситуация наблюдается в [3] с лигандом, который имеет схожую макроциклическую полость с L2b и L4.

В случае Bi^{3+} было показано уменьшение содержания несвязанного в комплекс катиона и, соответственно, подавление экстракции катиона Д2ЭГФК уже при pH 3 ввиду комплексообразования со всеми рассмотренными лигандами (рис. 6а). Аналогично описанному выше подходу Ac^{3+} можно определить стехиометрию и константы образования комплексов BiL_n (рис. 6б). Полученные результаты свидетельствуют об образовании комплексов с Bi^{3+} в том числе с L1a. Причём в случае лигандов без карбоксильных групп (L1a, L2a и L3a) происходит образование двух типов комплексов BiL и BiL_2 , так как наклон зависимости $\frac{D_0/D-1}{[L]}$ от $[L]$ составляет 1,4-1,5 (рис. 6б). Константы устойчивости соответствующих комплексов были рассчитаны согласно уравнению $\frac{D_0/D-1}{[L]} = K_{\text{ML}_2}[\text{L}] + K_{\text{ML}}$ (табл. 5).

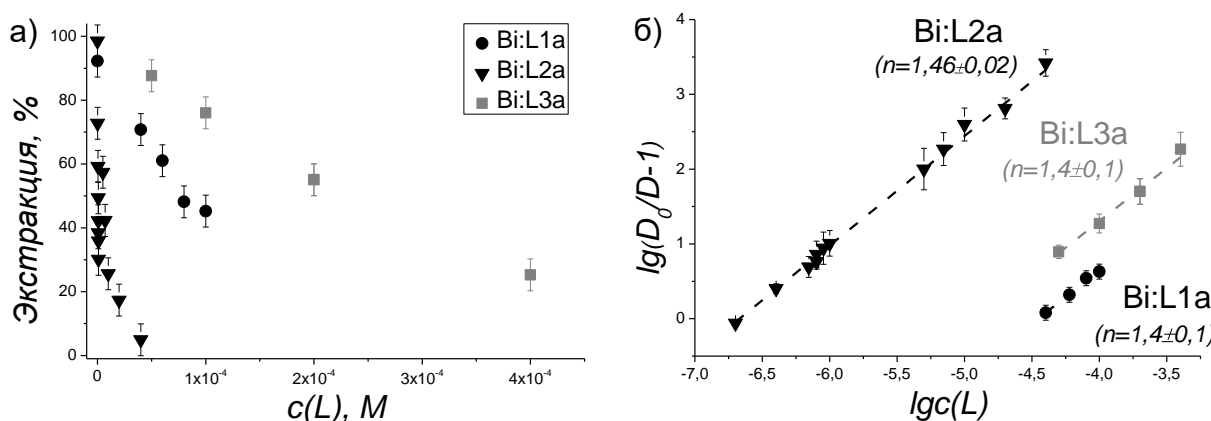


Рис. 6. Зависимость степени извлечения (а) и коэффициента распределения (б) Bi^{3+} при экстракции Д2ЭГФК от концентрации лигандов L1a, L2a и L3a.

Лиганд L1a образует малоустойчивые комплексы с Bi^{3+} , в то время как устойчивость BiL_2a и BiL_3a выше на 10 порядков. Кроме того, $\lg K$ присоединения второго лиганда к BiL равно $\lg K$ образования BiL . Принимая во внимание пропорциональность $\lg K$ и свободной энергии Гиббса реакции, можно предположить, что свободные энергии образования связей с обеими молекулами лигандов приблизительно равны. Последнее может быть следствием электронейтральности лигандов L1a, L2a, L3a, то есть присоединение второго лиганда происходит к трёхзарядному иону BiL^{3+} , так же как и первого лиганда к Bi^{3+} .

При переходе к лигандам, содержащим карбоксильные и пиридиновые группы, также заметно уменьшение степени извлечения катиона в органическую фазу с увеличением содержания лиганда в растворе, при этом во всех случаях происходит образование комплексов состава 1:1 с Bi^{3+} .

Кроме того, при значениях $pH > 6$ несвязанный в комплекс Bi^{3+} осаждается в виде малорастворимого гидроксида, что позволяет рассчитать константы устойчивости комплексов BiL при известной стехиометрии. Результаты экспериментов по определению концентрации растворённых форм висмута в присутствии лигандов представлены на рис. 7: с увеличением концентрации лиганда растёт содержание висмута в растворе. Линейный характер этой зависимости подтверждает состав комплексов 1:1, что согласуется с данными для комплексов с РЗЭ и результатами жидкостной экстракции для Bi^{3+} .

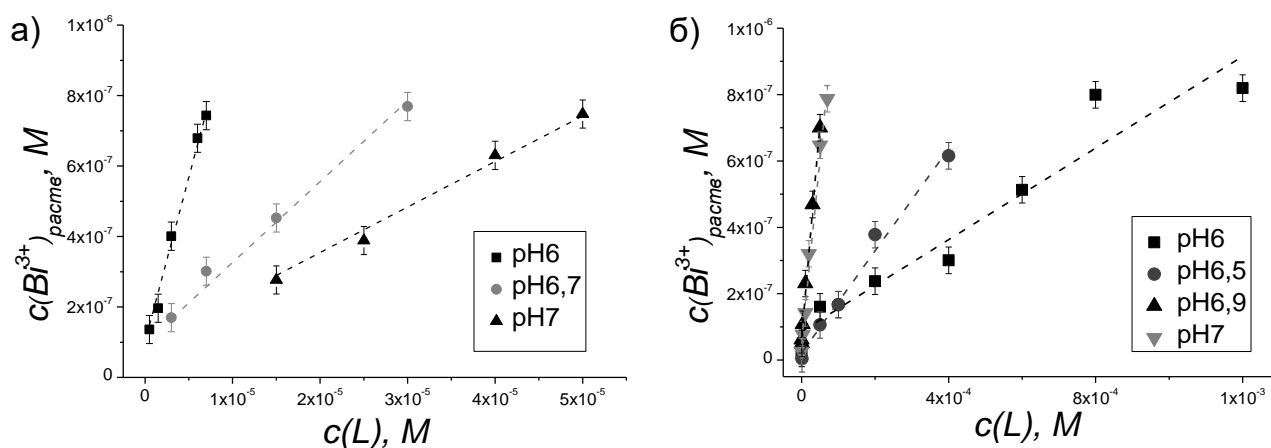


Рис. 7. Изменение концентрации растворённого Bi^{3+} с повышением концентрации лиганда при разных значениях pH: а) L2b; б) L3c.

Рассчитанные $\lg K_{BiL}$ для лигандов **L2b**, **L2c** и **L4** монотонно увеличиваются с повышением pH (рис. 8), что может быть следствием образования двух типов комплексов состава BiL и $BiL(OH)_m$. При этом отсутствие изменения константы устойчивости при более низких pH и, для L3b, в широком диапазоне pH свидетельствует о наличии единственного комплекса состава BiL . Для расчёта константы образования $BiL(OH)_m$ необходимо учесть вклад от этого комплекса согласно реакции: $Bi^{3+} + L + mH_2O \rightleftharpoons BiL(OH)_m + mH^+$. В таком случае

описание зависимости кажущейся константы устойчивости $K_{BiL}^{каж}$ от концентрации $[OH^-]$ полиномиальной функцией

$$K_{BiL}^{каж} = K_{BiL} + K_{BiL(OH)_m} \cdot [OH^-]^m$$

позволяет

определить $K_{BiL(OH)_m}$. Для лигандов, содержащих две карбоксильные группы, наблюдается линейная зависимость, что соответствует комплексу состава $BiL(OH)$, образование которого представляется логичным ввиду однозарядного характера

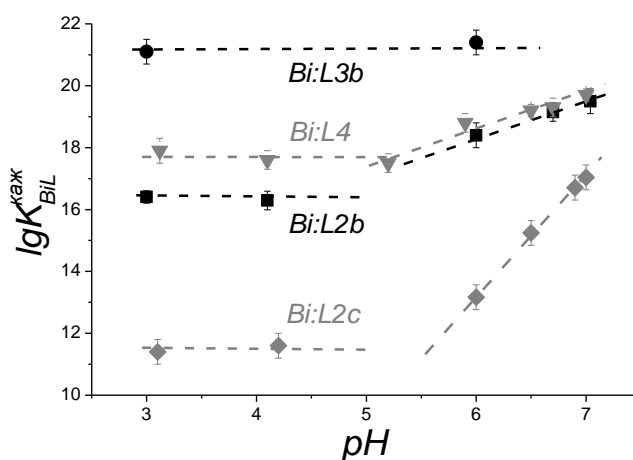


Рис. 8. Рассчитанные значения логарифма кажущейся константы устойчивости комплексов BiL в зависимости от pH.

BiL2b⁺ и BiL4⁺. С другой стороны, описание зависимости для BiL2c³⁺ с положительными коэффициентами полинома возможно минимально при m=3, что соответствует электронейтральному характеру L2c, т.е. при повышении pH BiL2c³⁺ переходит в BiL2c(OH)₃. Рассчитанные значения констант комплексообразования приведены в табл. 5.

Таблица 5 – Рассчитанные lgK для комплексов BiL_n и BiL(OH)_m

комплекс	L1a	L2a	L2b	L2c	L3a	L3b	L4
BiL ₂	8,4±0,2	24,2±0,1	-	-	27,3±0,3	-	-
BiL	4,4±0,2	12,5±0,1	16,4±0,3	11,5±0,2	14,4±0,3	21,3±0,2	17,4±0,3
BiLOH			26,4±0,2	-		-	26,4±0,2
BiL(OH) ₃	-		-	37,4±0,4		-	-

ЛССЭ для реакций комплексообразования с Bi³⁺ (только комплексы 1:1, табл. 5) и протонирования L (ΣpK_a) (рис. 9) хорошо описывается прямой, что подтверждает корректность полученных значений, и отсутствие стереохимического влияния на комплексообразование в рассматриваемых макроциклах. Наклон полученной зависимости составляет 0,9±0,1 и близок к соответствующему значению для Pb²⁺ (рис. 4б), что также согласуется со схожей жёсткостью Pb²⁺ и Bi³⁺ [2].

По сравнению с РЗЭ комплексы BiL с полиаминополикарбоксилатами характеризуются существенно большей устойчивостью, что проявляется и в рассматриваемой серии азакраун-эфиров. Более того, Bi³⁺ образует комплексы с безкарбоксилатными лигандами L1a, L2a, L2c и L3a, что не наблюдается для РЗЭ. Высокая устойчивость BiL с амин-содержащими лигандами объясняется с точки зрения корреляции устойчивости полиаминных комплексов с аммиакатами: чем более устойчивы аммиакаты катиона, тем более устойчивы его комплексы с полиаминами. Среди рассмотренных катионов наибольшей устойчивостью с NH₃ обладает комплекс Bi(NH₃) lgK=5,0, менее устойчив комплекс с Cu²⁺ lgK(Cu(NH₃))=4,27, в то время как расчётные значения для РЗЭ крайне малы lgK(РЗЭ(NH₃))=0,2-0,7 [4]. Аналогичный порядок устойчивости комплексов по ряду катионов наблюдается и в рассматриваемом случае.

Важнейшей характеристикой комплекса является его устойчивость in vivo в средах биологического значения. Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с последующей автордиографией для комплекса EuL3b было показано, что в изотоническом растворе соотношение EuL3b/Eu³⁺ меняется от 80/20 до 70/30 в течение суток (рис.10а): 10% потери

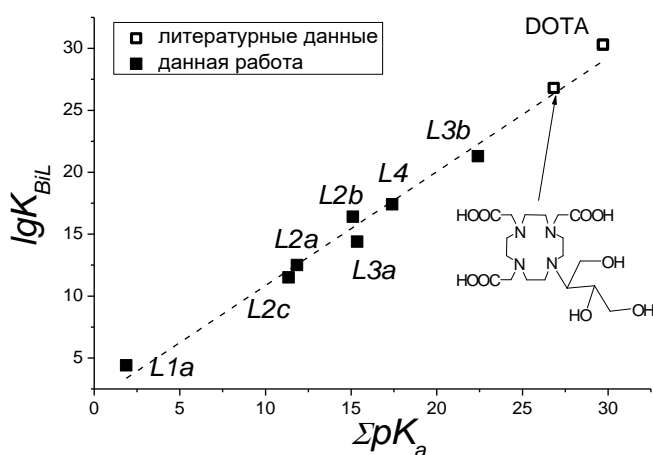


Рис. 9. ЛССЭ реакций комплексообразования с Bi³⁺ и протонирования лигандов.

связанного катиона могут быть обусловлены наличием значительного избытка комплексообразующего хлорид-иона. Перехелатирования сывороточными белками при выдерживании комплекса в сыворотке выявлено не было (рис.10б). Таким образом, несмотря на относительно невысокие значения констант устойчивости (табл. 3) комплексов с РЗЭ, они проявляют устойчивость в средах биологического значения.

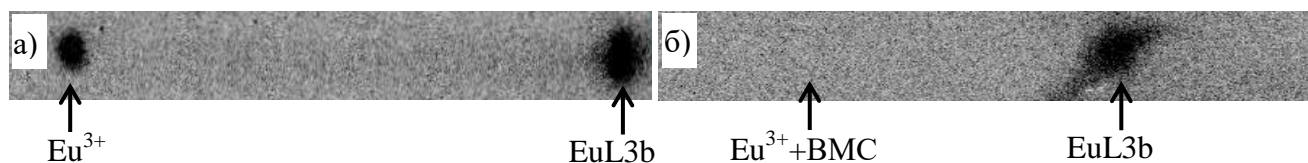


Рис. 10. Результаты ТСХ после выдерживания раствора EuL3b: а) в физиологическом растворе в течение суток; б) в сыворотке в течение 3 суток.

4 Исследование структуры комплексов

При комплексообразовании L4 с Y^{3+} , Bi^{3+} и Eu^{3+} наблюдается гипсохромный сдвиг полос поглощения лиганда с максимумами при 275 и 305 нм, что свидетельствует об участии краун-эфирного фрагмента в образовании комплексов (рис. 11). В случае пиридин-содержащих лигандов сам лиганд L3b не проявляет хромофорных свойств: отсутствие поглощения не позволяет наблюдать картину, аналогичную L4.

Методом TRLIFS для комплексов EuL3b и EuL4 было определено число молекул воды в ближайшем координационном окружении катиона: EuL4 ($\tau=423\pm 15$ мкс, $N(H_2O)= 2,0\pm 0,1$) и EuL3b ($\tau=368\pm 57$ мкс, $N(H_2O)= 2,5\pm 0,4$).

Полученные значения указывают на то, что 2 положения в координационной сфере Eu^{3+} в комплексе EuL4 заняты молекулами воды. В то же время для комплекса EuL3b можно предположить, что от 2 до 3 координационных мест в окружении Eu^{3+} занято молекулами воды. Остальная часть координационной сферы занята донорными атомами лиганда. Очевидно, ввиду их большей электроотрицательности, 3 карбоксильные группы и 3 атома N макроцикла принимают участие в координации в случае EuL3b. Отсутствие влияния остальных атомов N, ввиду их малой склонности к протонированию, представляется логичным, но, возможно, ввиду жёсткой структуры макроцикла, они оказывают некоторый эффект, что приводит к нецелочисленному значению $N(H_2O)=2,5$. Последнее предположение согласуется с результатами квантово-химического моделирования геометрии комплекса EuL3b: расстояния до атомов азота макроцикла можно подразделить на две группы: более короткие до алифатических N макроцикла 2,6-2,9 Å и более длинные 3,1-3,4Å до

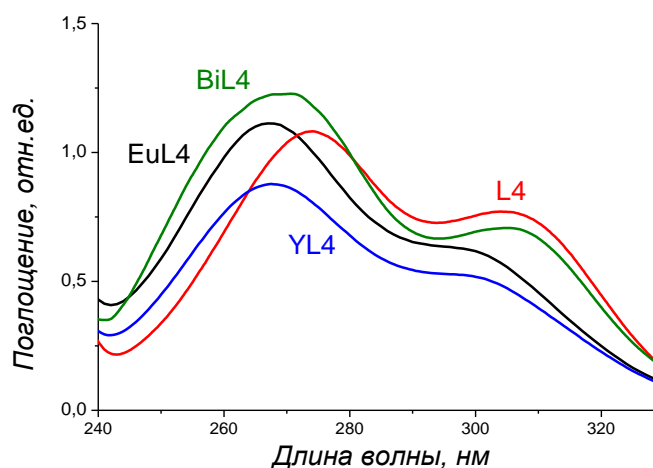


Рис. 11. Спектры поглощения в УФ области для растворов L4 с добавлением M^{3+} .

карбамидных и пиридинового N. Кроме того, геометрия BiL3b (рис.12а) незначительно отличается от EuL3b, что является следствием большого размера макроцикла L3b. Однако Bi^{3+} , по причине меньшей жёсткости и большего сродства к донорным атомам N, образует более короткие связи со всеми макроциклическими атомами азота.

Квантово-химический расчёт с учётом 2 молекул воды показывает, что в образовании комплекса $\text{EuL4}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ участвует карбонильная группа фенила. Рассчитанные методом функционала плотности (DFT) межатомные расстояния Eu-N, Eu-O 2,2-2,6Å соответствуют расстояниям, характерным для комплексов Eu^{3+} с полиаминополикарбоксилатами. В отличие от EuL4, Bi^{3+} образует комплекс с транс-L4 (рис.12б), также преимущественно занимая положение над плоскостью частично свернутого краун-эфира, что приводит к более коротким расстояниям Bi-O и Bi-N по сравнению с Eu-O и Eu-N. Вследствие этого комплекс BiL4 устойчивее РЗЭЛ4 (табл. 3, 5). Кроме того, по сравнению с комплексами Eu с DOTA некоторые межатомные расстояния M-O, M-N в комплексах с L4 длиннее, что приводит к меньшей устойчивости комплексов с L3b и L4 по сравнению с DOTA и ДТРА.

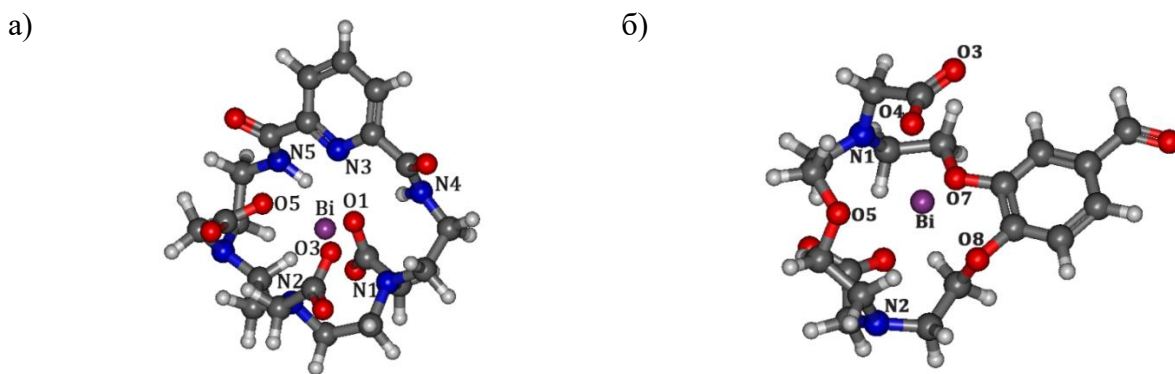


Рис. 12. Оптимизированная геометрия комплекса BiL3b (а) и BiL4 (б).

Для исследования структуры комплексов в растворе был использован метод EXAFS. Полученные из обработки спектров рентгеновского поглощения (рис. 13) для BiL длины

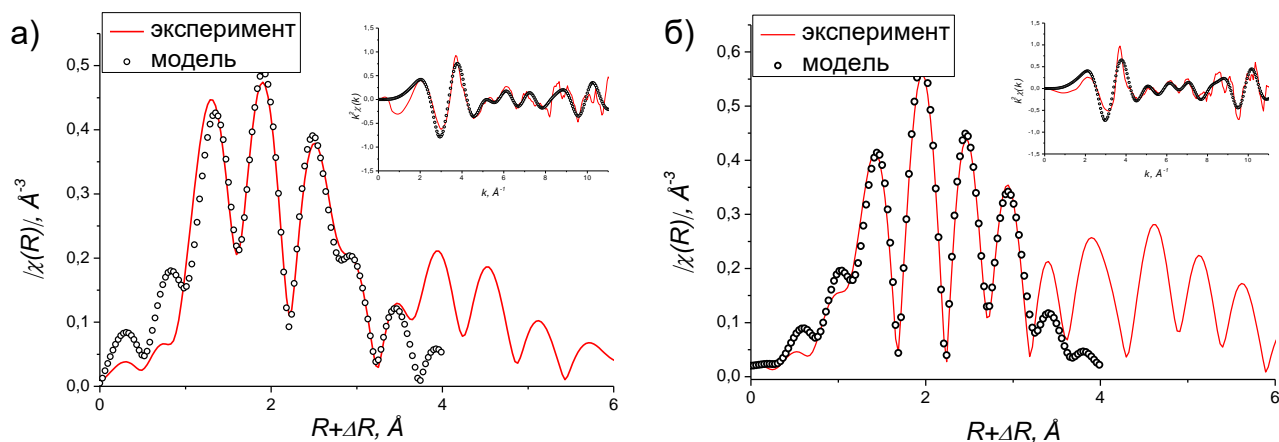


Рис. 13. Обработанные спектры рентгеновского поглощения для BiL в k и R - пространстве:

а) L=L3b; б) L=L4.

связей с лёгкими атомами O, N (табл. 6) согласуются с данными квантово-химического расчёта геометрии комплексов BiL и соответствуют расстояниям Bi-O, Bi-N, равным 2,3-2,6Å в комплексах с DOTA и DTPA.

Таблица 6 – Межатомные расстояния и координационные числа, полученные из спектров EXAFS на L_{III} крае висмута в комплексах BiL3b и BiL4

комплекс	BiL3b				BiL4			
	О	О	N	N	О	О	О	N
R, Å	1,9	2,5	2,8	3,3	2,1	2,4	3,0	3,6
К.ч.	1±1	3±1	4±2	3±2	3±2	5±3	3±2	7±5

5 Кинетика комплексообразования Y^{3+} , Bi^{3+} азакраун лигандами, DOTA и DTPA

Для сравнения времени связывания катионов исследуемыми лигандами и известными хелаторами DOTA и DTPA был использован метод спектроскопии поглощения в УФ-области с использованием Арсеназо III, который образует окрашенные комплексы с Y^{3+} (поглощение при 657 нм). Из рис. 14 видно, что образование комплекса YL (L=L3b, L4) происходит в

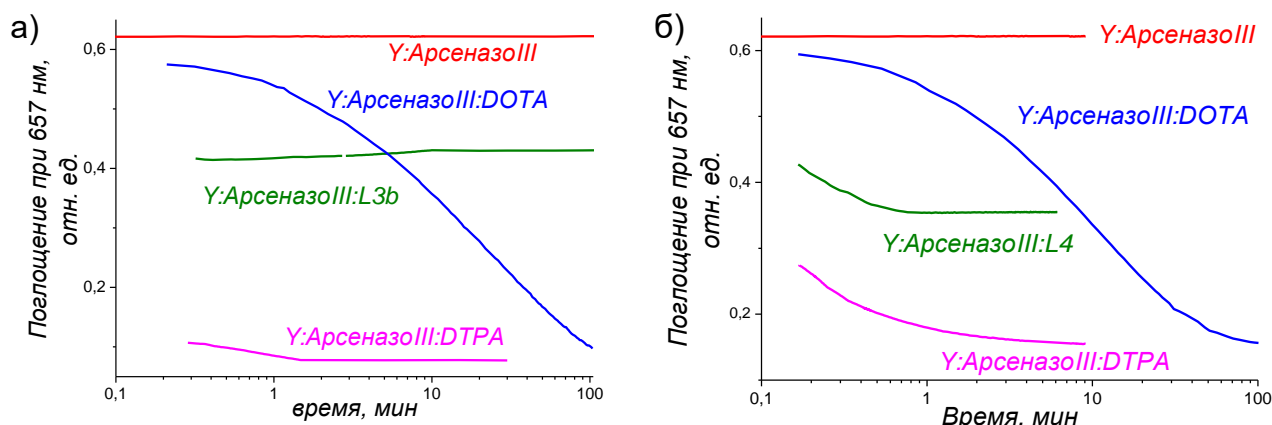


Рис. 14. Зависимость оптической плотности при 657 нм (комплекс Y-АрсеназоIII) от времени реакции при pH6,5: L=L3b (а) и L=L4 (б).

течение 1 минуты, что в тех же условиях сравнимо с «золотым стандартом» быстрого комплексообразования DTPA и на порядок быстрее, чем DOTA. В то же время в данных условиях DTPA и DOTA полностью связывают катион, а L – только частично: часть катиона остаётся в комплексе с Арсеназо III. Аналогичные результаты были показаны для Bi^{3+} .

6 Радиолитис исследованных лигандов

Для оценки радиационной стойкости лигандов L3b и L4 было использовано гамма-излучение ^{137}Cs ($E_{\gamma}=661,6кэВ$), мощность дозы в точке расположения образца составила 3Гр/мин. Согласно спектроскопии в УФ-видимом диапазоне по мере увеличения накопленной дозы происходит незначительное изменение спектров поглощения растворов лигандов в сторону понижения концентрации на 5-10%, что может быть следствием деструкции молекулы под действием излучения. Данные ESI MS и МАЛДИ MS показали для L4 при 330 Гр и 4300 Гр, что исходная молекула сохраняется, но при большой накопленной

дозе в масс-спектре выявляются фрагменты без функциональных подвесных групп и продукты димеризации молекул (рис. 15).

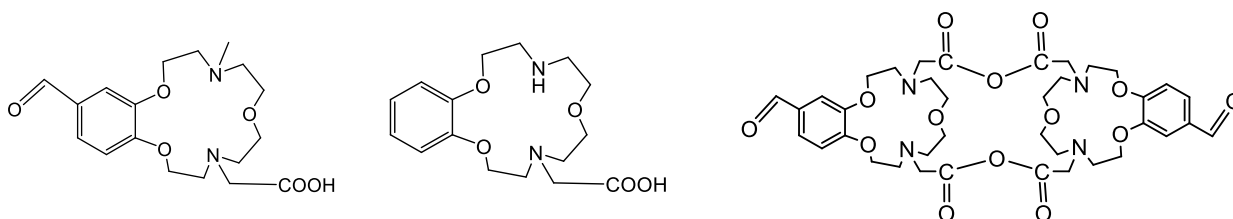


Рис. 15. Некоторые продукты радиолиза L4 после экспозиции 330 и 4300 Гр.

Для определения комплексообразующей способности L3b и L4 после радиолиза (330Гр) был проведён сравнительный эксперимент с Vi^{3+} методом конкурирующей реакции осаждения $\text{Vi}(\text{OH})_3$ при pH6. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении комплексообразования в данных системах. Таким образом, указанные дозы не оказывают влияния на комплексообразование азкараун-эфирами в модельных растворах.

7 Цитотоксичность исследованных лигандов

Для оценки цитотоксичности использовали клеточные линии промиелоцитарного лейкоза HL-60 и лимфобластной лейкемии MOLT-4, а также нормальные лимфоциты здоровых доноров. Использовали классический МТТ-тест, который показывает влияние соединения на пролиферацию клеток (рис. 16). Полученные зависимости показывают, что здоровые клетки более устойчивы к воздействию лигандов. Причём в случае L4 наблюдается практически одинаковый отклик для обеих клеточных линий лейкоза, а для L3b наблюдается некоторое различие, что находит отражение в рассчитанных из кривых выживаемости экстраполяцией и интерполяцией значениях полулетальных концентраций (табл. 7).

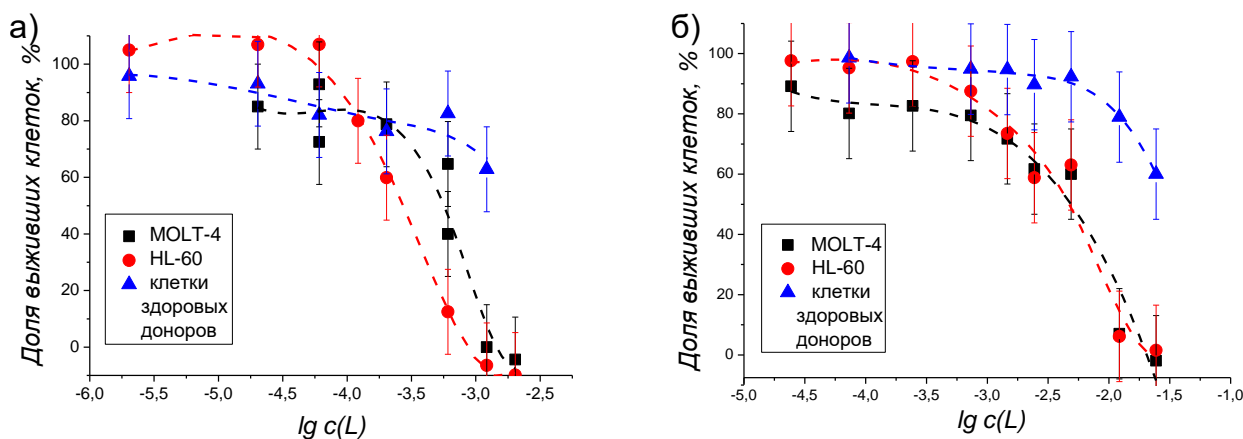


Рис. 16. Зависимость выживаемости клеток от концентрации лиганда: а) L3b; б) L4.

Таблица 7 – Полулетальные концентрации ЛК50 лигандов для клеточных линий лейкозов HL-60 и MOLT-4 и нормальных лимфоцитов.

Клетки	HL-60	MOLT-4	Клетки здоровых доноров
L3b	$2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$	$6,3 \cdot 10^{-4} \text{M}$	$3,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$
L4	$4 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$4 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$3,3 \cdot 10^{-2} \text{M}$

Таким образом, по предварительной оценке, токсическое влияние самих краун-эфиров как на нормальные, так и на злокачественные клетки минимально. Кроме того, полученные значения полулетальных концентраций хелаторов традиционно не достигаются при синтезе РФП (используются концентрации в диапазоне $1 \cdot 10^{-10}$ - $1 \cdot 10^{-8}$ М).

Выводы

1. Образование устойчивых комплексных соединений РЗЭ и Ac^{3+} с арил-содержащими азакраун-эфирами определяется наличием карбоксильных групп, в то время как Cu^{2+} , Pb^{2+} и Bi^{3+} образуют комплексы со всеми рассмотренными лигандами;
2. Наиболее устойчивые комплексы образуют Cu^{2+} ($lgK=16$) и Bi^{3+} ($lgK=21$) с пиридин-содержащей азакраун-трикарбоновой кислотой, что пропорционально их сродству к предшественнику аминов – аммиаку;
3. Константы устойчивости комплексов с Cu^{2+} , Pb^{2+} , Bi^{3+} прямо пропорциональны константам протонирования лигандов;
4. Комплексообразование азакраун-эфирами осуществляется по краун-эфирному фрагменту. При этом, близкое расположение макроцикла, а, соответственно, и донорных атомов азота, способствует образованию более устойчивого комплекса Bi^{3+} по сравнению с РЗЭ³⁺. Связи М-Н недостаточно коротки для образования комплексов, сравнимых по устойчивости с аналогичными комплексами DOTA и ДТРА;
5. Азакраун-эфиры образуют комплексы с катионами радионуклидов медицинского назначения в течение 1 мин при комнатной температуре, что на 2 порядка быстрее реакций комплексообразования известных макроциклических лигандов;
6. Краун-эфирный фрагмент арил-содержащих азакраун-эфиров радиационно устойчив по крайней мере до 4300 Гр, но функциональные группы более радиационно чувствительны;
7. Аза-краун эфиры сами по себе в концентрациях, применяемых в РФП, не оказывают токсического влияния как на лейкемические клетки MOLT-4, HL-60, так и на клетки здоровых доноров.

Список цитируемой литературы

1. Shannon R.D. // Acta Crystallographica. A. 1976. Vol. 32. P. 751-767
2. Martell A.E., Hancock R.E. Metal complexes in aqueous solutions, Springer Science+Business Media New York 1996
3. Chang C.A., Ochaya V.O. // Inorg.Chem. 1986. Vol. 25. N 3. P. 355-358.
4. Mulla F., Marsicano F., Nakani B.S., Hancock R.D. // Inorg.Chem. 1985. Vol. 24. N 19. P. 3076-3080.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Egorova B. V., Oshchepkov M. S., Fedorov Yu. V., Fedorova O. A., Budylin G. S., Shirshin E. A., Kalmykov S. N. Complexation of Bi^{3+} , Ac^{3+} , Y^{3+} , Lu^{3+} , La^{3+} and Eu^{3+} with benzo-diazacrown ether with carboxylic pendant arms // Radiochimica Acta. – 2016. – V. 104. – N. 8. – P. 555-565.

2. Fedorov Yu V., Fedorova O.A., Peregudov A., Kalmykov S.N., Egorova B.V., Arkhipov D., Zubenko A.D., Oshchepkov M.S. Complex formation of pyridine-azacrown ether amide macrocycles with proton and heavy metal ions in aqueous solution // *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2016. – V. 29. – N. 5. – P. 244-250.
3. Егорова Б.В., Ощепков М.С., Федоров Ю.В., Калмыков С.Н., Федорова О.А. Изучение комплексообразования бензоазакраун-лиганда с катионами иттрия, лютеция и лантана в водных растворах // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2013. – Т. 27. – N. 2. – С. 55-61.
4. Egorova B.V., Oshchepkov M.S., Zubenko A.D., Fedorov Yu.V., Fedorova O.A., Budylin G.S., Shirshin E.A., Kalmykov S.N. Pyridine containing azacrown ligands as possible chelators for Bi^{3+} , Y^{3+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} in aqueous solutions // 9th International conference on nuclear and radiochemistry. – Helsinki. – 2016. – P.449.
5. Matazova E.V., Egorova B.V., Oshchepkov M.S., Zubenko A.D., Fedorov Yu.V., Fedorova O.A., Kalmykov S.N. Complex of europium with azacrown-ether: stability in aqueous solutions and fetal bovine serum // 9th International conference on nuclear and radiochemistry. – Helsinki. – 2016. – P.464.
6. Егорова Б.В., Зубенко А.Д., Ощепков М.С., Фёдоров Ю.В., Фёдорова О.А., Будылин Г.С., Ширшин Е.А., Митрофанов А.А., Зубавичус Я.В., Калмыков С.Н. Связывание Y^{3+} , Ac^{3+} , Lu^{3+} , Eu^{3+} , Bi^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} пиридин- и фенил содержащими аза-краун-эфирами // X Конференция молодых ученых, аспирантов и студентов ИФХЭ РАН «Физикохимия – 2015». – Москва. – 2015. – С.97.
7. Егорова Б.В., Ощепков М.С., Зубенко А.Д., Фёдоров Ю.В., Будылин Г.С., Ширшин Е.А., Митрофанов А.А., Фёдорова О.А., Калмыков С.Н. Комплексы новых азакраун-эфиров с Ac^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Pb^{2+} // VIII Всероссийская конференция по радиохимии «Радиохимия-2015». – Железногорск. – 2015. – С.441.
8. Oshchepkov M.S., Egorova B.V., Mutasova A.D., Fedorov Yu V., Kalmykov S.N., Fedorova O.A. Binding of Bi^{3+} , Ac^{3+} , Y^{3+} , Lu^{3+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} by azacrown ligands in aqueous solutions // «Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов» - «Радиофарма-2015». – Москва. – 2015. – С.21.
9. Egorova B.V., Mitrofanov A.A., Oshchepkov M.S., Fedorov Y.V., Fedorova O.A., Kalmykov S.N. Binding of Bismuth, Actinium and Yttrium by benzoazacrown ether in aqueous solutions // 9th Symposium on Targeted Alpha Therapy. – Warsaw. – 2015. – P.72.
10. Egorova B.V., Oshchepkov M.S., Fedorov Yu V., Kalmykov S.N., Fedorova O.A. Complexation of Yttrium, Lutetium, Actinium and Bismuth by new benzo-diaza-crown ether ligand in aqueous solutions // 17th Radiochemical Conference. – Marianske Lazne. – 2014. – P.450.
11. Egorova B.V., Oshchepkov M.S., Fedorov Yu V., Kalmykov S.N., Fedorova O.A. Yttrium, Lutetium and Lanthanum binding by new azacrown ligand in aqueous solutions // The First Russian-Nordic Symposium on Radiochemistry “RNSR-2013”. – Moscow. – 2013. – P.94.