

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
им. А.Н.НЕСМЕЯНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПИРИДИН-СОДЕРЖАЩИХ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ И
АЦИКЛИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОНОВ КАК КОМПОНЕНТОВ
РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ**

1.4.3. – Органическая химия

Автор: Щукина Анна Алексеевна

Научный руководитель: д.х.н., проф. Федорова Ольга Анатольевна

Москва 2024

Одним из методов лечения и диагностики онкологических заболеваний является ядерная медицина. Она использует радиофармпрепараты, которые доставляют радионуклид к раковым клеткам, чтобы добиться их гибели при радиоактивном облучении. Радиофармпрепараты состоят из активного радионуклида, связывающего его хелатора и транспортной биомолекулы. Для возможности применения хелаторов в качестве компонентов радиофармпрепаратов они должны обладать высокой термодинамической устойчивостью комплексов; быстрым комплексообразованием при комнатной температуре; устойчивостью комплексов в биологической среде; и наличием функциональной группы для конъюгации с векторной молекулой.

Хелаторы можно разделить на 2 больших класса – это макроциклические и ациклические комплексоны. К достоинствам макроциклических хелаторов можно отнести образование устойчивых комплексов, но часто комплексообразование происходит медленно и требует повышенных температур. Ациклические лиганды быстро образуют комплексы при комнатной температуре, но часто их комплексы неустойчивы в условиях *in vivo*.

Наиболее используемыми хелаторами для радионуклидов на данный момент являются производные макроциклического комплексона **ДОТА** и ациклического **ДТРА** (Рис.1), которые уже применяются в клинической практике в составе радиофармпрепаратов. Однако известно, что число разработанных радиофармпрепаратов немногочисленно и имеется потребность в разработке новых комплексонов для терапевтических и диагностических радионуклидов.



Рисунок 1. Лиганды **ДОТА** и **ДТРА**.

Поэтому целью данной работы является синтез и исследование новых ациклических и макроциклических хелаторов, перспективных для применения в составе радиофармпрепаратов. В задачи работы входило: разработка методов получения новых ациклических полиаминных и пиридинсодержащих комплексонов с различными хелатирующими группами; синтез макроциклических хелаторов; изучение комплексообразующих свойств полученных хелаторов с катионами металлов в водных растворах и биологических жидкостях; разработка бифункциональных хелаторов для

радиофармацевтического применения. В ходе работы нами был осуществлен синтез лигандов 3 типов – это макроциклические, ациклические, основанные на полиаминной цепочке и ациклические пиридинсодержащие комплексоны.

На первом этапе работы были получены исходные соединения для синтеза комплексонов – диэфир **1** и алкилирующие агенты **3** и **4**. С целью получения макроциклов различного размера проводили реакцию макроциклизации между диэфиром **1** и тетра- или пентааминами в метаноле при комнатной температуре без использования темплатных агентов и техники высокого разбавления (Рис.2).

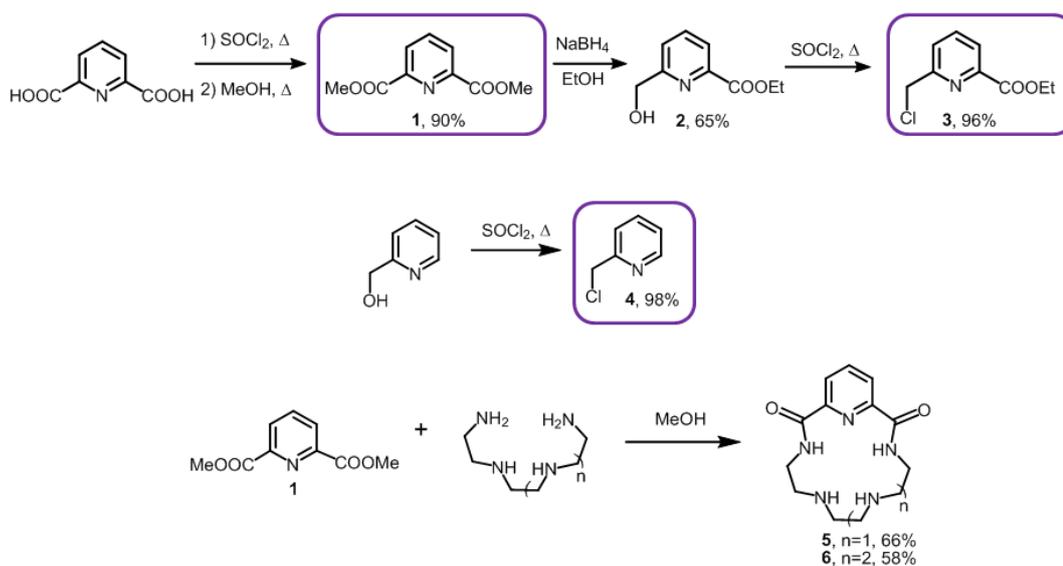


Рисунок 2. Синтез исходных соединений.

Далее в структуру макроциклов по реакции N-алкилирования вводили карбоксильные, пиколиновые, пиридинные и ацетамидные хелатирующие группы. Реакции проводились при кипячении в ацетонитриле. Кроме того, по модифицированной реакции Кабачника-Филдса были введены фосфонатные группы (Рис.3).

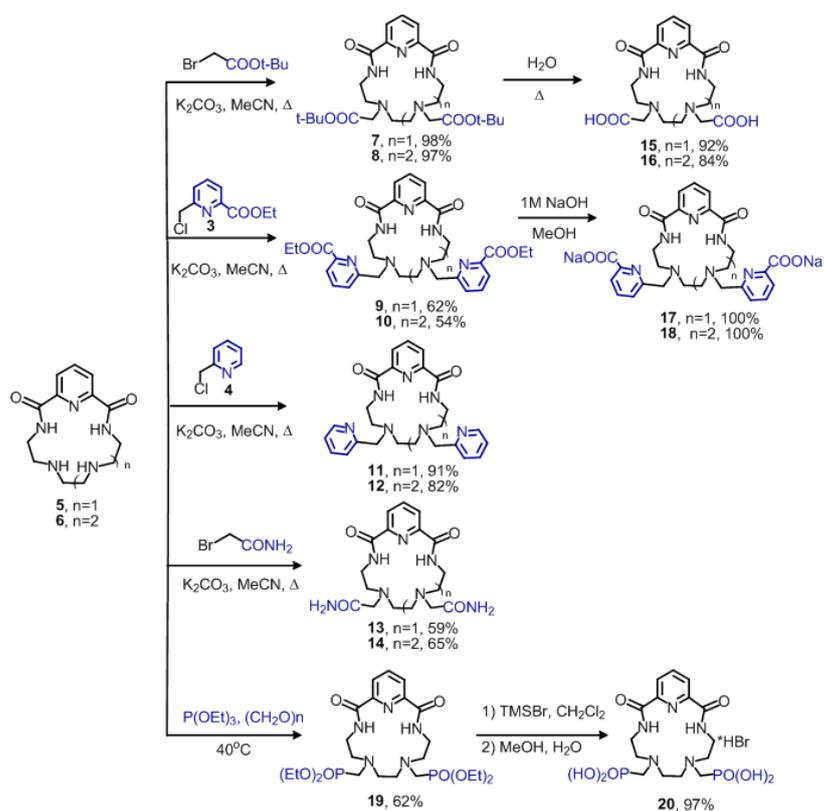


Рисунок 3. Синтез пиридинсодержащих макроциклических комплексов.

Известно, что селективная модификация вторичных аминов в присутствии первичных является сложной синтетической задачей. В нашей работе впервые был предложен метод макроциклизации полиаминов в амидные азакраун-соединения в качестве метода защиты первичных аминогрупп. В данном случае вторичные амины доступны для модификации. Так, гидролиз макроциклов **9-12** в кислых условиях приводит к получению соединений **21-24** с незамещенными терминальными аминогруппами, которые далее модифицировали и получали комплексы с комбинированными хелатирующими группами. Так, была получена серия лигандов с карбоксильными, ацетамидными, сукцинаматными и фосфонатными хелатирующими группами (Рис.4).

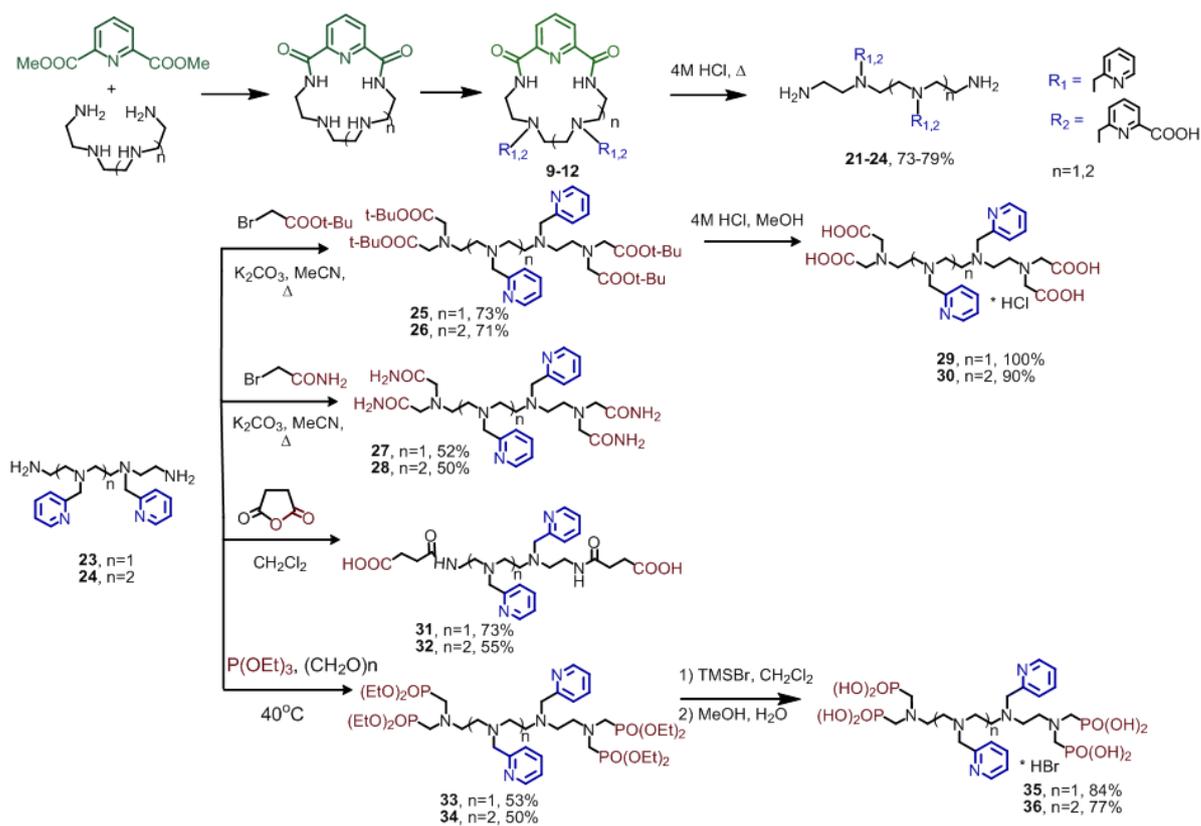


Рисунок 4. Синтез полиаминных ациклических комплексов.

Лиганды 2 типа – пиридинсодержащие ациклические комплексоны - получали с использованием этилендиамина. Так, исходное соединение **37** получали аминированием сложного эфира этилендиамином. Для получения амина **40** было предложено использование 2 методов синтеза – алкилирование этилендиамина 2,6-дихлорметилпиридином **38** и через получение основания Шиффа с использованием диальдегида **39** (Рис.5).

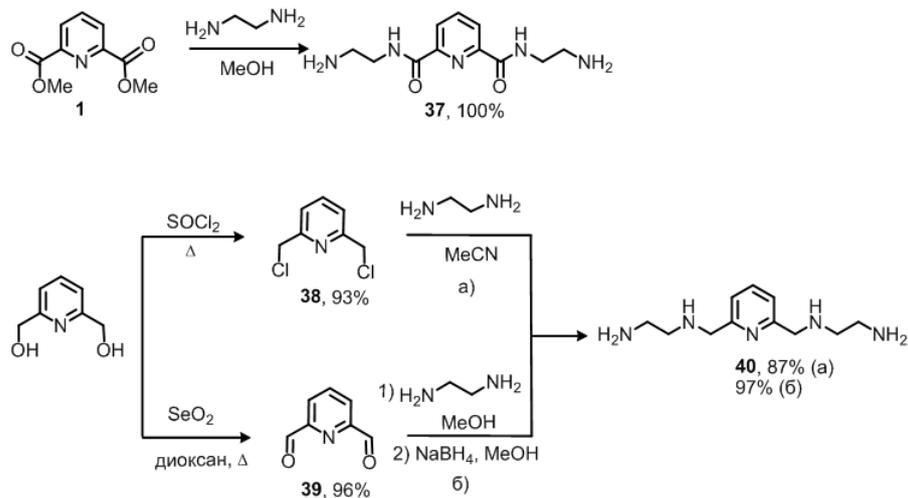


Рисунок 5. Синтез пиридинсодержащих ациклических комплексов.

Далее в полученные полиамины **31** и **34** были введены дополнительные ацетатные, сукцинаматные, фосфонатные и ацетамидные хелатирующие группы. В результате была получена серия лигандов с различными хелатирующими группами, которые содержат жесткий пиридиновый фрагмент, который обеспечивает удобную платформу для дальнейшей функционализации для связывания с векторными молекулами, а также наличие предварительной организации молекулы для быстрого и прочного связывания катионов металлов (Рис. 6).

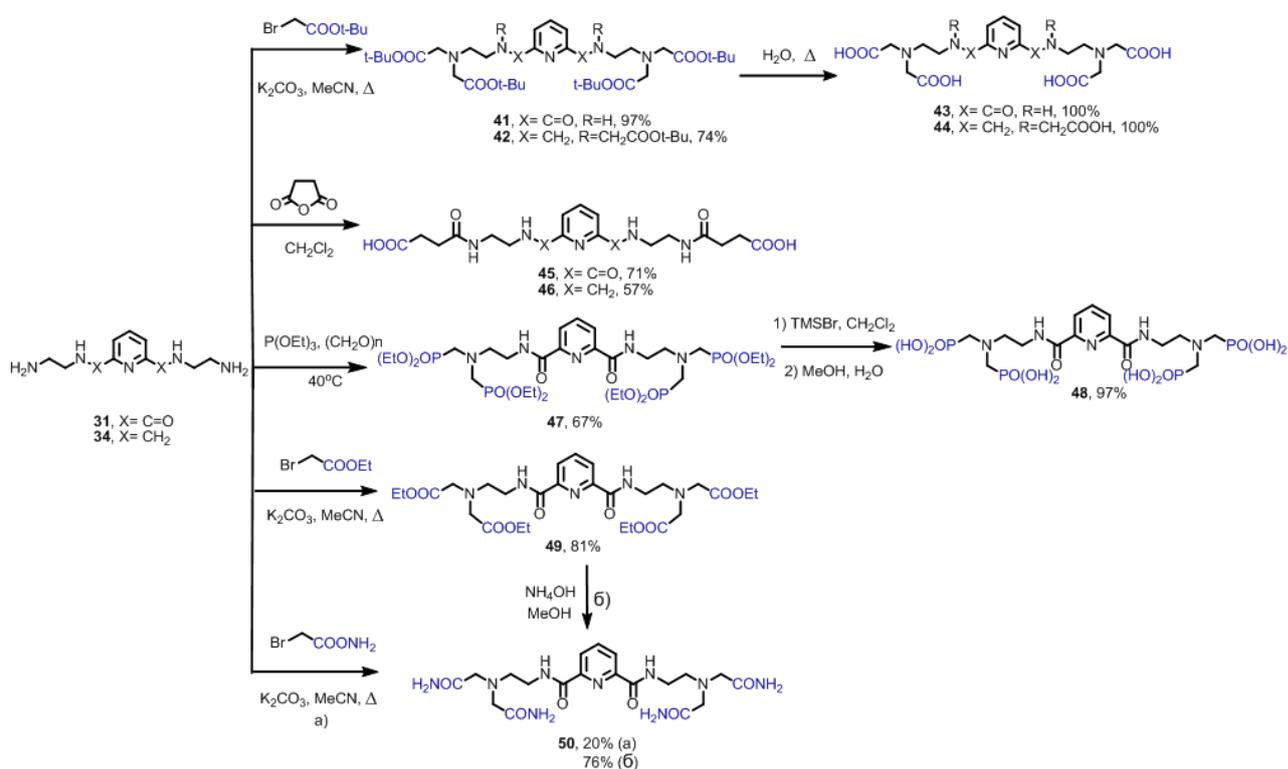


Рисунок 6. Синтез пиридинсодержащих ациклических комплексонов.

Для связывания комплексона с векторной биомолекулой необходимо ввести в структуру лиганда дополнительную функциональную группу. Обычно это требует разработки нового многостадийного синтеза по сравнению с нефункционализированными производными. Нами были введены дополнительные функциональные группы в 4-положение пиридина. Так, был получен макроциклический бифункциональный хелатор **55**. Синтез начинали с коллидина, из которого получали триэфир с дальнейшим проведением реакции макроциклизации и введением дополнительных хелатирующих групп. На последней стадии был проведен селективный гидролиз сложноэфирной группы с получением целевого продукта **55** (Рис.7).

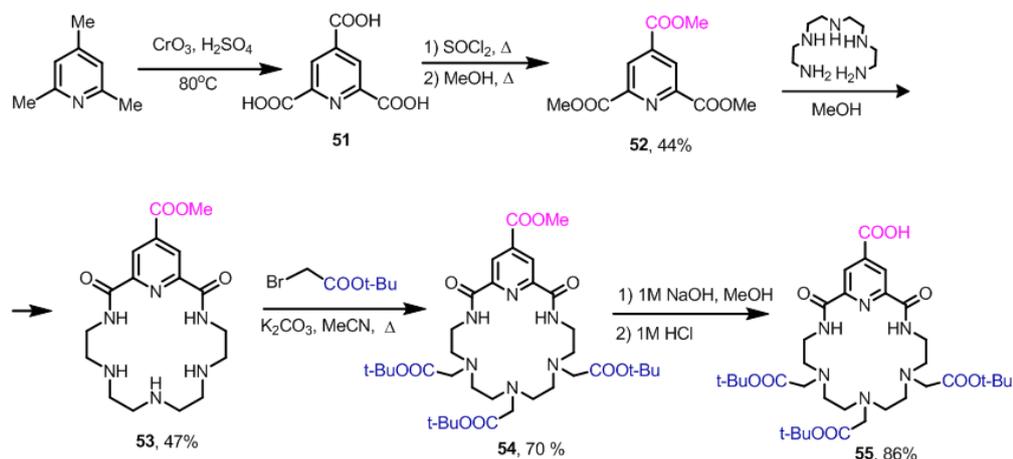


Рисунок 7. Синтез бифункциональных комплексов.

Для получения ациклического бифункционального хелатора **64** в качестве исходного соединения использовалась хелидамовая кислота. Синтез проводили с введением защитной бензильной группы, затем через получение основания Шиффа получали соединение **60**, из которого в несколько стадий был получен бифункциональный ациклический лиганд **64** (Рис.8).

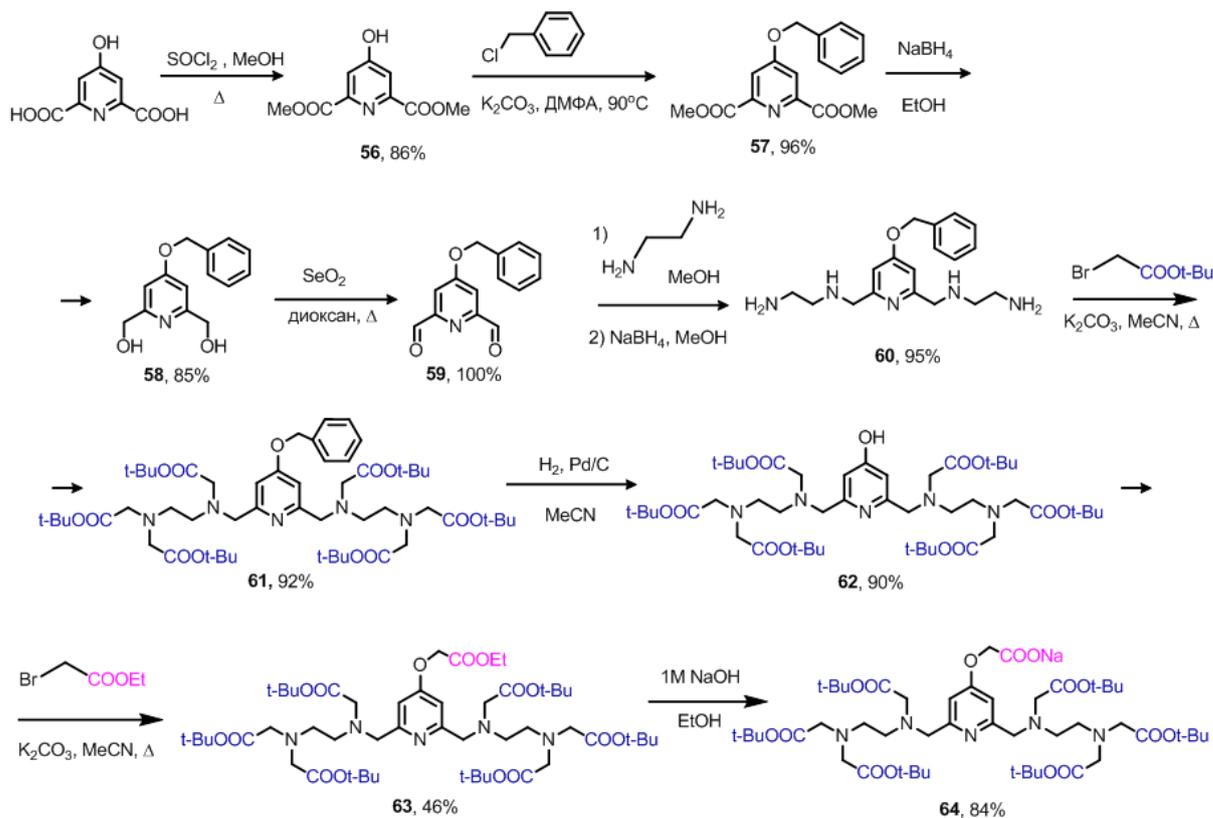


Рисунок 8. Синтез бифункциональных комплексов.

На следующем этапе проводилось исследование комплексообразующих свойств полученных лигандов для оценки возможности их применения как компонентов радиофармпрепаратов. Методы исследования комплексообразующих свойств включают в себя ЯМР-спектроскопию, масс-спектрометрию, потенциометрическое титрование, РСА, DFT-расчеты, ВЭЖХ, исследование меченых радионуклидами и исследования стабильности *in vitro* и биораспределения *in vivo*.

Для исследования комплексообразования лиганды были поделены на три группы в зависимости от типа хелатирующих групп – это пиколинатные, ацетатные и ацетамидные макроциклические и ациклические хелаторы. Строение лиганда и тип хелатирующих групп влияют на устойчивость, стехиометрию комплекса и селективность к различным катионам металлов. Исследования проводили с катионами Ga^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Y^{3+} , Bi^{3+} и Pb^{2+} . Выбор был обоснован важностью радиоактивных изотопов этих металлов для медицинских применений.

Методами потенциометрического титрования и жидкостной экстракции были получены константы устойчивости комплексов для макроциклических и ациклических пиколинатных лигандов **17**, **18**, **21**, **22** с Cu^{2+} и Bi^{3+} в водных растворах. В результате титрования лигандов и смеси лигандов с солями металлов в широком диапазоне pH получали кривые титрования, из которых затем рассчитывали константы протонирования лигандов и константы устойчивости комплексов. Продемонстрировано, что константы устойчивости комплексов с Cu^{2+} и Bi^{3+} выше с ациклическими лигандами, чем с макроциклическими, при этом самый термодинамически устойчивый комплекс наблюдается для ациклического лиганда **22** с Bi^{3+} .

С помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии в тяжелой воде было изучено образование комплексов с катионом висмута. Во всех спектрах висмутовых комплексов **17**, **18**, **21**, **22** происходят значительные изменения по сравнению со спектром исходного лиганда.

На основе анализа данных ЯМР можно предположить структуры висмутовых комплексов, представленные на слайде. Для макроциклических лигандов **17** и **18** не наблюдается участие атома азота пиридина амидопиридинового фрагмента в комплексообразовании, в то время как атомы азота пиколинатных групп как макроциклических, так и ациклических лигандов участвуют в координации катиона (Рис.9).

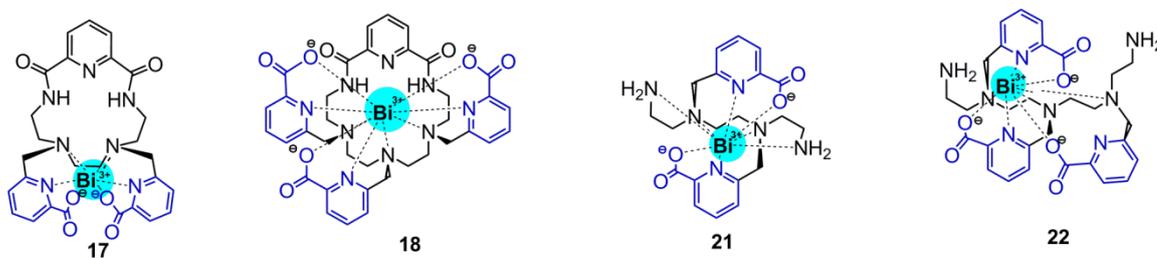


Рисунок 9. Предполагаемые структуры комплексов.

Методом масс-спектрометрии было подтверждено образование комплексов состава 1:1 и 2:1 со всеми лигандами. Для медных комплексов были исследованы кристаллические структуры методом РСА. В случае макроциклического лиганда **18** образуется комплекс внешней координации состава 2:1, что подтверждают данные масс-спектрометрии, при этом пиридин макроциклической части не принимает участия в комплексообразовании. В случае ациклического лиганда **21** образуется комплекс состава 1:1 (Рис.10).

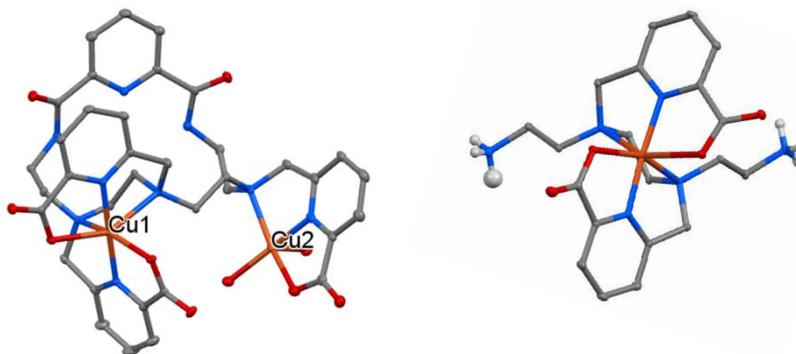


Рисунок 10. РСА комплексов лигандов **18** и **21** с Cu^{2+} .

Для оценки устойчивости комплексов лигандов **17**, **18**, **21**, **22** с катионом Cu^{2+} в биологических средах проводились исследования *in vitro* в избытке белков фетальной бычьей сыворотки. Выявлено, что для всех комплексов имеет место перехелатирование катиона меди. При этом для комплекса макроциклического лиганда с тремя пиколиновыми группами показана большая устойчивость комплекса, чем у ациклических лигандов, что свидетельствует о его большей кинетической устойчивости.

Комплексообразование ациклических лигандов **43** и **44**, содержащих карбоксильные группы, изучалось с катионами Cu^{2+} , Bi^{3+} , Ga^{3+} и Y^{3+} . Методом потенциометрического титрования были оценены константы устойчивости комплексов ациклических хелаторов **43** и **44** в сравнении с их макроциклическими аналогами **15** и **16**. Показано, что наиболее термодинамически устойчивые комплексы образуются с катионом

Bi^{3+} , при этом константы устойчивости для ациклических лигандов на несколько порядков выше, чем для макроциклических, аналогично ранее обсуждаемым константам пиколинатных лигандов. Наиболее устойчивые комплексы образует ациклический лиганд **44**.

С помощью ВЭЖХ подтверждено образование комплексов **43** и **44** с ионами Ga^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} и Cu^{2+} . Например, анализ данных ВЭЖХ комплекса **44** с Ga^{3+} показал наличие в растворе трех форм комплекса. Методом МАЛДИ масс-спектрометрии проанализирован состав образующихся комплексов. Показано образование комплексов состава 1:1 и 2:1.

Методом ЯМР-спектроскопии была изучена структура комплексов **43**, **44** с катионами Bi^{3+} , Y^{3+} и Ga^{3+} . Было проанализировано смещение сигналов, их расщепление и проведено интегрирование сигналов, в результате чего были предложены следующие структуры комплексов в растворе, представленные на слайде (Рис.11). Так, в комплексе с иттрием в связывании катиона металла принимают участие все 6 ацетатных групп, образуя комплекс с симметрией C_2 , в то время как в комплексе с висмутом только 4 группы участвуют в комплексообразовании, а также атом азота пиридинового фрагмента. В случае комплекса с галлием наблюдается образование сложного спектра, что связано с присутствием в растворе нескольких частиц, что подтверждают данные ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Методом DFT были подтверждены структуры комплексов, которые хорошо согласуются с данными ЯМР. Например, показано образование комплексов состава 1:1 с иттрием и висмутом и 2:1 с галлием.

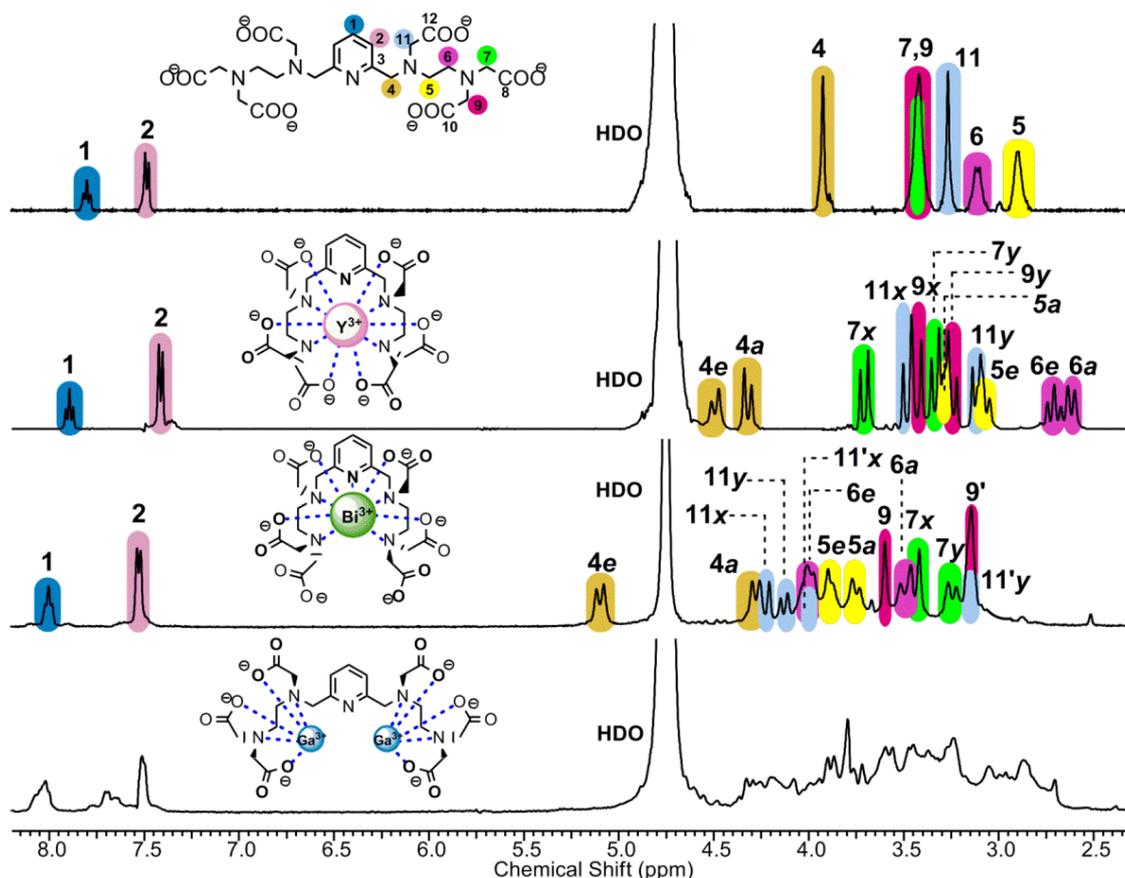


Рисунок 11. ^1H ЯМР спектр свободного лиганда **44** (pH=9.9) (а) и его комплексов с Y^{3+} (pH=7.2) (б), Bi^{3+} (pH=7.1) (в), Ga^{3+} (pH=6.3) (г) в D_2O .

При изучении устойчивости комплексов **43** и **44** в присутствии сывороточных белков показано, что оба комплекса с медью оказались неустойчивы, в то время как для катиона висмута и иттрия устойчивые комплексы образует хелатор **44**, а для катиона галлия оба лиганда показали хорошие результаты. Самые устойчивые комплексы образует лиганд **44**, не содержащий бисамидных групп, с катионом висмута.

Было проведено сравнение между макроциклическими и ациклическими хелаторами **13**, **14** и **50**, содержащими ацетамидные хелатирующие группы. Комплексообразование лигандов **13**, **14** и **50** изучали с катионами Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} , поскольку известно, что ацетамидные группы имеют сродство к хелатированию данных катионов металлов. С помощью потенциометрического титрования определены константы устойчивости комплексов с катионом свинца. Самые термодинамически устойчивые комплексы образует макроциклический лиганд **14**. При этом для макроцикла меньшего размера **13** методом потенциометрического титрования не было зафиксировано комплексов, что согласуется с данными масс-спектрометрии. Для ациклического лиганда

50 константа меньше, чем для макроциклического **14**. С помощью ^1H ЯМР-спектроскопии проводилось изучение структуры комплексов в водном растворе.

Методом РСА были изучены монокристаллы лиганда **13** и его комплексов с катионами Pb^{2+} и Cu^{2+} . Результаты исследований свободного лиганда **13** показали формирование открытой предорганизованной к комплексообразованию макроциклической полости. Координация катиона Pb^{2+} в комплексе происходит вне макроциклической полости за счет двух аминогрупп краун-соединения и атомов кислорода ацетамидных заместителей. Однако в случае меньшего по размеру катиона Cu^{2+} образуется инклюзивный комплекс, а в связывании катиона меди принимают участие две аминогруппы макроцикла, две ацетамидные группы и, вероятно, атом азота амидопиридинового фрагмента и пиридиновый атом азота. При этом хелатирующие группы расположены по обе стороны макроциклической полости, как и в случае свободного макроцикла, таким образом, полностью инкапсулируя катион Cu^{2+} (Рис.12).



Рисунок 12. РСА свободного лиганда **13** и его комплексов с Pb^{2+} и Cu^{2+} .

В случае комплекса **14** с Pb^{2+} аналогично комплексу **13** с Pb^{2+} образуется комплекс с внешней координацией. В отличие от катиона свинца катионы цинка и никеля находятся в полости макроцикла. При этом во всех случаях атом азота пиридина участия в координации катионов не принимает, а в связывании участвуют ацетамидные и аминогруппы макроцикла (Рис.13).

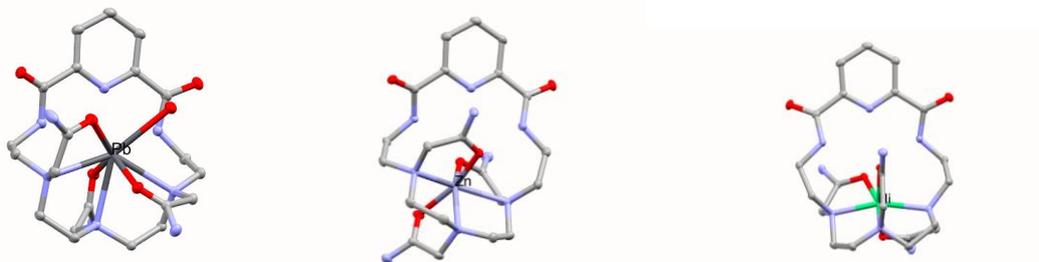


Рисунок 13. РСА комплексов лиганда **14** с Pb^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} .

На следующем этапе была показана возможность использования бифункциональных хелаторов как компонентов радиофармпрепаратов. Была произведена модификация поверхности наночастиц гексаферрита стронция бифункциональным производным **55**, которые связывали висмут-207 с выходом радиоактивного мечения более 99%. Была исследована устойчивость конъюгатов в избытке сывороточных белков, Показано, что стабильность после 24 часов инкубации составляет 85%. Кроме того, стабильность этого комплекса *in vivo* была доказана анализом профилей биораспределения в организме мыши.

Таким образом, в результате работы:

1. Впервые предложен метод макроциклизации полиаминов в амидные пиридинсодержащие азакраун-соединения в качестве метода защиты первичных аминогрупп. Метод позволяет селективно проводить модификацию по вторичным аминогруппам полиаминов с сохранением незамещенных первичных аминогрупп. Гидролиз в кислых условиях освобождает первичные аминогруппы, которые могут быть использованы для дальнейшего введения заместителей.

2. Впервые синтезированы ациклические хелаторы на основе полиаминов, содержащие два типа различных заместителей при атомах азота (пиридинильные, ацетатные, фосфонатные, сукцинаматные, ацетамидные).

3. Впервые синтезированы ациклические лиганды на основе пиридина, замещенного фрагментами полиамина, с дополнительными хелатирующими группами (ацетатные, ацетамидные, сукцинаматные, фосфонатные).

4. Впервые получены бифункциональные производные амидного азакраун-соединения и ациклического пиридинсодержащего лиганда, содержащие карбоксильную функциональную группу.

5. Проведенные физико-химические исследования комплексообразования ряда полученных лигандов показали, что ациклические лиганды демонстрируют более высокую термодинамическую устойчивость комплексов в водных растворах, но меньшую кинетическую инертность в биологических жидкостях. Среди исследованных катионов металлов Ga^{3+} , Y^{3+} , Bi^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Pb^{2+} образование устойчивых комплексов наблюдается в случае гексаацетатного пиридинсодержащего лиганда с катионами Bi^{3+} , Ga^{3+} , Y^{3+} .